

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Recherches sur l'immunisation antituberculeuse

PAR M. H. VALLÉE.

PROFESSEUR A L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Nous avons entrepris à partir de l'année 1903, une longue série de recherches sur la vaccination antituberculeuse des bovidés qui, incomplètement achevée, nous paraît toutefois offrir un intérêt suffisant pour légitimer cette publication.

Notre maître, M. le Dr Roux, nous a, durant tous nos travaux, prodigué les plus précieux conseils. Son nom aurait dû être inscrit en tête de ce mémoire; qu'il nous permette au moins de dire que si ces recherches offrent quelque valeur, c'est à lui qu'en revient le mérite.

Nous n'avons à faire ici ni l'histoire, ni l'examen critique des travaux publiés jusqu'alors sur l'importante question qui nous intéresse. A ces points de vue, nous renvoyons aux intéressants mémoires de MM. Calmette et Guérin, présentés ici même et à notre rapport d'ensemble, qui paraîtra incessamment dans le volume des travaux du *Congrès international de Médecine vétérinaire de la Haye*.

Nos recherches ont porté, au laboratoire, sur un total de 166 bovidés et, dans la pratique rurale, sur environ 500 veaux (1).

Nous avons réalisé des tentatives de vaccination, soit à l'aide de *bacilles vivants* convenablement choisis, soit à l'aide de *bacilles tués* selon divers procédés. Ces produits ont été utilisés suivant des modes variés : inoculations intra-veineuse, hypodermique, ou par ingestion. La résistance des animaux mis en expérience a été recherchée par inoculations intra-veineuses,

(1) Ce mémoire ne fait mention que des seules expériences qui nous ont paru avoir une valeur probante.

par ingestions virulentes, par cohabitation des sujets supposés vaccinés avec des animaux affectés de tuberculose pulmonaire ouverte.

Nous nous proposons d'exposer ici, dans un but purement documentaire, la marche de ces diverses expériences et les résultats obtenus.

PREMIÈRE PARTIE

Vaccination à l'aide de bacilles vivants.

CHOIX DES BACILLES A UTILISER A TITRE DE VACCINS

Parmi les cultures des collections de l'Institut Pasteur, deux types bacillaires paraissaient, de par leur médiocre virulence, tout indiqués pour constituer, à l'égard des bovidés, de véritables *virus-vaccins*.

Le premier d'entre eux, de type humain, provient du laboratoire du professeur Behring; sa virulence pour le cobaye est insignifiante; le second, jadis isolé par Nocard d'un cas de tuberculose du cheval, tout d'abord très virulent, a perdu progressivement son activité. Il est aujourd'hui presque avirulent pour le cobaye. L'inoculation sous-cutanée d'un milligramme de ce bacille provoque chez cette espèce une lésion locale et une adénite inguinale qui rétrocèdent spontanément après plusieurs semaines. Seules, des doses supérieures à 8-10 milligrammes déterminent des lésions envahissantes.

La vaccination des bovidés contre la tuberculose à l'aide de bacilles de provenance humaine ayant fait déjà, lorsque nous avons commencé nos propres recherches, l'objet de nombreux et importants travaux, il nous a paru plus intéressant, plus original aussi, d'utiliser dans nos essais un bacille autre que celui de l'homme dont l'usage était vivement critiqué et paraissait dangereux à conseiller pour des raisons qu'il est inutile de préciser ici.

Notre choix s'est donc porté sur le bacille équin dont il vient d'être parlé.

Une première expérience permet d'établir que les qualités vaccinantes apparentes de ce bacille et du bacille humain dont nous disposions, sont *équivalentes*.

EXPÉRIENCE. — Deux veaux bretons âgés d'un mois, reconnus indemnes de tuberculose, reçoivent, dans la veine jugulaire, chacun 4 milligrammes de bacilles frais isolés d'une culture de six semaines, l'un du bacille humain, l'autre du bacille équin précités. 85 jours plus tard, seconde inoculation, dans les mêmes conditions, de 40 milligrammes des mêmes bacilles. 150 jours après la seconde intervention, les deux animaux sont éprouvés, en même temps que deux témoins neufs, de même race et de même âge, par inoculation intra-veineuse de 2 milligrammes d'un bacille bovin très virulent. 40 jours après l'épreuve, l'un des témoins meurt et offre des lésions généralisées de tuberculose; 75 jours après l'épreuve, on sacrifie le témoin survivant, fort amaigri, et les deux vaccinés qui demeurent en parfaite santé. A l'autopsie: chez le témoin, lésions caséuses généralisées; chez les vaccinés, pas trace d'une lésion tuberculeuse constituée.

Il était donc indiqué d'utiliser dans nos expériences, au lieu et place des bacilles d'origine humaine déjà employés par divers auteurs, ce bacille équin que l'essai sus-indiqué révèle doué de qualités identiques à celles des bacilles humains.

Notre choix étant arrêté, il convenait de rechercher en premier lieu le sort des bacilles inoculés à titre de vaccin et leur rapidité de résorption par l'organisme des animaux traités; il fallait aussi s'assurer de leur innocuité pour le bœuf. L'expérience qui suit nous paraît établir de façon certaine ce point particulier.

Une vache bretonne reçoit dans la veine jugulaire 100 milligrammes de bacilles équins prélevés sur une culture âgée de six semaines, dilués dans 10 c. c. d'eau physiologique. Un mois plus tard, l'animal réagit à la tuberculine, puis demeure, dès le troisième mois, indifférent à ce réactif. Sacréfié un an après l'inoculation, il n'offre pas trace d'une lésion tuberculeuse, et les cobayes inoculés avec la pulpe de ses ganglions trachéo-bronchiques, restent indemnes.

Les tentatives suivantes établissent la marche de la résorption chez le bœuf des bacilles équins inoculés, soit dans le torrent circulatoire, soit sous la peau.

EXPÉRIENCE. — Vingt-trois bovidés, tous reconnus indemnes à l'épreuve de la tuberculine et entretenus au pâturage, sont inoculés, soit à une, soit à deux reprises, soit sous la peau, soit dans la veine jugulaire, avec des bacilles équins recueillis sur une culture de six semaines.

De ce nombre, 6 sujets reçoivent, *une seule fois*, 5 milligrammes de bacilles dans la jugulaire et 8 bovins, 10 milligrammes sous la peau de l'épaule; 5 animaux reçoivent *deux fois* à 2 mois de distance, 5 puis 20 milligrammes de bacilles dans la jugulaire et 4 sujets 10, puis 50 milligrammes sous la peau de l'épaule.

Tous ces animaux sont sacrifiés à partir du 95^e jour jusqu'au 209^e jour après l'inoculation, unique ou première. Examinés minutieusement, ils n'offrent aucune lésion tuberculeuse; les ganglions trachéo-bronchiques des sujets inoculés dans la jugulaire et les ganglions pré-scapulaires des animaux inoculés sous la peau, sont systématiquement recueillis et broyés en totalité. La pulpe est injectée pour chacun d'eux à une série de cobayes. Cette épreuve établit qu'à partir du 70^e jour, l'épuration bacillaire est complète chez les sujets inoculés une seule fois, soit dans la jugulaire, soit sous la peau et qu'elle n'est pas réalisée avant un délai d'égale durée à la suite de la *seconde inoculation* bacillaire, intra-veineuse ou sous-cutanée. Cette épreuve, lorsqu'elle fournit des résultats positifs, n'aboutit en aucun cas à l'apparition chez le cobaye d'une tuberculose envahissante; les lésions consécutives à l'injection de pulpes ganglionnaires bacillaires ne donnent lieu, comme l'inoculation à petite dose du bacille équin lui-même (en culture), qu'à la formation de lésions locales et du ganglion le plus voisin.

L'expérience qui précède prouve que le bacille équin mis à l'étude possède les qualités préalables exigibles de tout vaccin : *son inoculation est inoffensive; sa résorption est relativement aisée et rapide; il ne récupère aucune virulence au cours de son séjour dans l'organisme qui l'héberge.*

CHOIX DU BACILLE UTILISÉ DANS LE CONTROLE EXPÉRIMENTAL DE L'IMMUNITÉ CONFÉRÉE

D'emblée, nous avons choisi comme virus d'épreuve un bacille bovin isolé, depuis quinze ans au moins, par Nocard, du lait d'une vache tuberculeuse. Parallèlement entretenu à l'Institut Pasteur et dans notre laboratoire par repiquages successifs, sans retour à un organisme, ce bacille s'est constamment montré d'une égale et extrême virulence. Outre les preuves de ce fait rapportées dans le présent travail, on trouvera à ce sujet d'importantes indications dans nos mémoires relatifs aux expériences de Melun sur la vaccination de von Behring, publiés en collaboration avec M. Rossignol (1).

VACCINATION PAR VOIE VEINEUSE

Nous avons suivi, dans nos expériences sur ce point, une technique très analogue à celle indiquée par Behring pour la *Bovovaccination*.

Toutes nos expériences ont porté sur des animaux âgés de

(1) ROSSIGNOL et VALLÉE, *Bulletin de la Société de Médecine vétérinaire et pratique* 1906, p. 39.

moins de six mois au moment de la première tentative de vaccination ; dans tous les cas, les sujets ont été préalablement tuberculinés. Comme vaccin, ont toujours été utilisés des bacilles équins non desséchés, extraits de cultures âgées de 6 semaines ; les émulsions obtenues au mortier d'agate ont été constamment effectuées à raison de 1 milligramme de bacilles par centimètre cube d'eau physiologique.

Deux séries d'expériences sont réalisées. Dans la première, *vingt animaux* reçoivent tout d'abord 5 milligrammes de bacilles frais ; puis, 85 jours plus tard, 20 milligrammes des mêmes bacilles ; dans la seconde, *dix sujets* reçoivent, à 90 jours d'intervalle, 4 puis 40 milligrammes des bacilles précités.

A la suite de la première vaccination, on relève chaque jour, durant près d'un mois, la température des animaux. Chez aucun d'eux, l'on n'observe d'écart thermiques. La même précaution, prise à la suite de la seconde vaccination, indique que quelques sujets offrent de légères oscillations de température. Tous nos sujets vaccinés n'ont cessé de présenter les signes d'une parfaite santé ; leur croissance a été normale.

Successivement, tous ces animaux sont soumis, dans les conditions exposées ci-dessous, à diverses épreuves de contrôle, destinées à apprécier le degré de la résistance conférée.

Epreuves par voie veineuse. — 1^o Six mois après la seconde vaccination, 10 animaux de la première série (5 et 20 milligrammes de vaccin) sont éprouvés, en même temps que deux témoins, par inoculation intra-veineuse de 3 milligrammes de bacille bovin. Trois mois après l'épreuve, on sacrifie 8 vaccinés et un témoin ; un autre témoin et 2 vaccinés sont conservés. A l'autopsie, le témoin présente une tuberculose miliaire massive des deux poumons, des lésions hépatiques, spléniques et rénales ; son amaigrissement est extrême. Tous les vaccinés sont, au contraire, en excellent état ; tous aussi présentent des lésions discrètes des ganglions annexes du poumon, qui offrent chacun un ou deux tubercules miliaires caséifiés ; le poumon et les autres viscères paraissent indemnes.

Un an après l'épreuve, on sacrifie les deux vaccinés et le témoin restants. Ce dernier est cachectique et présente à l'autopsie des lésions caséuses massives, étendues à tous les viscères et à leurs ganglions ; les vaccinés sont en parfait état de

graisse; ils offrent quelques petits tubercules pulmonaires calcifiés et des lésions à peine appréciables des ganglions annexes du poumon.

2^o Cinq mois après la seconde vaccination, 4 animaux de la seconde série (4 et 40 milligrammes de vaccin) sont éprouvés, en même temps que deux témoins, par inoculation intra-veineuse de 2 milligrammes de bacille bovin. L'un des témoins meurt en 34 jours de pneumonie caséeuse; 80 jours après l'épreuve, on sacrifie le témoin survivant et les 4 vaccinés; le témoin présente des lésions généralisées et caséeuses de tuberculose; les vaccinés sont totalement indemnes en apparence, toutefois l'inoculation au cobaye indique que leurs ganglions trachéobronchiques contiennent des bacilles virulents.

Une conclusion première se dégage nettement de cet essai: la vaccination confère une *résistance relative* aux animaux qui en font l'objet, et *cette résistance est proportionnelle à la quantité de bacilles inoculés à titre préventif*.

Epreuves par les voies digestives. — Une année après la seconde vaccination, 7 bovins de la première série de vaccination (5 et 20 milligrammes de vaccin) sont éprouvés en même temps que deux témoins par ingestion à la sonde de 10 centigrammes par tête de bacille bovin. Cinq mois après l'épreuve, on pratique sur tous les animaux une injection de tuberculine. Les deux témoins et quatre des bovins vaccinés réagissent nettement. Au sixième mois de l'épreuve, on sacrifie tous les animaux. Tous présentent des lésions très discrètes de quelques ganglions mésentériques et des tubercules dans les ganglions rétrapharyngiens; le poumon paraît indemne, mais ses ganglions annexes sont virulents pour le cobaye.

Cette expérience établit que *la vaccination par voie veineuse n'est nullement valable, après quelques mois, contre l'infection par les voies digestives*.

Epreuves de contamination. — En même temps que les recherches précédemment rapportées se poursuivaient au laboratoire, nous cherchions, par des expériences entreprises dans les conditions de la pratique rurale, à apprécier la valeur pratique de la méthode. Ces expériences ont porté sur 278 animaux. Quelques-unes d'entre elles seulement sont démonstratives.

1^o Huit jeunes bovidés sont vaccinés par inoculations intra-

veineuses de 5 et 20 milligrammes de bacilles équins, pratiquées à 70 jours d'intervalle. Durant les semaines consécutives à la vaccination, deux des vaccinés sont conservés dans l'étable qui compte des tuberculeux; les six autres sont mis au pâturage avec des animaux tuberculeux, ce qui, d'après les données acquises sur la contagion tuberculeuse entre bovidés, constitue un danger négligeable. Trois mois après la seconde vaccination, tous les animaux sont placés à l'étable en contact avec d'autres bovidés affectés de tuberculose ouverte; une injection de tuberculine pratiquée trois mois plus tard, révèle l'existence de la tuberculose chez cinq des huit vaccinés. Tous les animaux sont sacrifiés dans des délais variant de 12 à 14 mois après la seconde vaccination; deux sur huit offrent des lésions généralisées de tuberculose; les six autres présentent des altérations d'importance variable, limitées au poumon ou à ses ganglions annexes;

2^o En raison de l'extrême gravité des épreuves mises en œuvre dans l'expérience qui précède, un autre essai fut réalisé dans des conditions de contamination, certaines aussi mais moins sévères. Vingt-six génisses flamandes ou hollandaises sont vaccinées par voie veineuse, à deux reprises, à trois mois d'intervalle, et maintenues à l'abri de toute contamination accidentelle. Trois mois après la seconde vaccination, les animaux sont rentrés à l'étable et mêlés aux autres sujets de l'exploitation, une centaine environ; l'effectif compte un minimum de 60 0/0 de tuberculeux, tous cependant en bon état apparent. Après trois années de contact, les vaccinés qui, en raison de la vente de quelques-uns d'entre eux, ne sont plus qu'au nombre de 18, soumis à une épreuve de tuberculine, comptent 9 tuberculeux, soit 50 0/0. Les témoins fournissent à la même épreuve 60 0/0 de sujets infectés;

3^o Vingt-sept autres veaux nés de mères tuberculeuses dans la proportion de 80 0/0, sont vaccinés dans les conditions précédemment énoncées, séparés de leurs mères et allaités au lait bouilli. Trois mois après la dernière vaccination, ces sujets sont répartis dans des étables contaminées. Tuberculins deux et trois ans après la vaccination, ils fournissent des réactions positives à raison de 14 animaux sur 26.

VACCINATION PAR VOIE SOUS-CUTANÉE

Nous avons cherché à obtenir, toujours à l'aide du bacille équin, l'immunisation par inoculation hypodermique du vaccin, en raison de la facilité de mise en pratique qu'offrirait un tel procédé.

Six jeunes bovidés indemnes de tuberculose reçoivent sous la peau de l'épaule, à deux reprises, à trois mois d'intervalle, d'abord 10, puis 50 milligrammes de bacilles équins.

Epreuves. — 1^o Six mois après la seconde vaccination, deux de ces sujets sont éprouvés, en même temps que deux témoins et deux bovins vaccinés par voie veineuse (2^e série 4 et 40 milligrammes de vaccin), par inoculation intrajugulaire de 2 milligrammes de bacille bovin. Tous les animaux sont sacrifiés trois mois après l'épreuve; seuls, les deux sujets vaccinés par voie veineuse *paraissent à l'autopsie indemnes de toute lésion*; leurs ganglions trachéo-bronchiques sont cependant virulents pour le cobaye. Les témoins présentent des lésions généralisées de tuberculose et *les animaux vaccinés par la voie hypodermique offrent des altérations presque aussi graves que celles de ces sujets*;

2^o Une année après la seconde vaccination, les quatre derniers sujets inoculés sous la peau, et deux animaux vaccinés par voie veineuse (1^{re} série, 5 et 20 milligrammes de vaccin) sont éprouvés, en même temps que deux témoins, par ingestion à la sonde de 10 centigrammes de bacilles bovins.

Tous ces sujets sont sacrifiés six mois après l'épreuve. Les témoins et les animaux vaccinés par voie hypodermique offrent des lésions d'égale importance : adénopathies mésentériques caséuses ou calcifiées, lésions des ganglions rétro-pharyngiens et annexes du poumon. Les deux animaux vaccinés par voie veineuse paraissent indemnes; mais tous les cobayes inoculés avec les ganglions mésentériques, rétro-pharyngiens et trachéo-bronchiques meurent tuberculeux;

3^o Huit bovidés, appartenant à différentes races, sont à deux reprises vaccinés par voie sous-cutanée, dans les conditions sus-indiquées. Durant la période d'immunisation, l'un de ces sujets est entretenu dans une étable contaminée, les sept autres vivent au pâturage. Trois mois après la seconde vaccination, ces animaux

sont placés dans une étable infectée, mêlés à des tuberculeux porteurs de lésions ouvertes, en même temps que huit animaux vaccinés par voie veineuse, dont l'histoire est indiquée précédemment (page 591). Soumis à une épreuve de tuberculine trois mois après le début de la contamination, tous ces sujets, sauf un, réagissent à la tuberculine.

Les diverses expériences qui viennent d'être rapportées établissent, nous semble-t-il, de la façon la plus nette, *l'infériorité extrême des résultats fournis par l'insertion sous-cutanée des bacilles utilisés à titre de vaccin.*

VACCINATION PAR LES VOIES DIGESTIVES

Nos expériences ont été orientées dans ce sens à la suite de faits intéressants relevés au cours d'épreuves par ingestion d'animaux vaccinés par voie veineuse. (Novembre 1905.)

Quatre animaux vaccinés par inoculation intra-jugulaire (2^e série 4 et 40 milligrammes de vaccin) ingèrent, en même temps que quatre bovins témoins, 9 mois après la vaccination, aux 1^{er}, 10^e, 33^e, 111^e jours de l'épreuve, à quatre reprises par conséquent, 50 centigrammes chaque fois et par tête de bacilles bovins virulents. Ces ingestions sont faites au seau et non à la sonde. Un seul des témoins réagit à l'épreuve de tuberculine effectuée 45 jours après le dernier repas virulent. Sacré, il présente des lésions tuberculeuses pulmonaires discrètes et tout au début, ainsi qu'un foyer caséux d'un ganglion de la chaîne mésentérique. Tuberculinés un mois plus tard, les trois témoins survivants ne réagissent point encore. Il est à penser qu'ayant reçu des bacilles très divisés, émulsionnés dans plusieurs litres d'eau, qui se sont dilués encore plus largement dans les réservoirs gastriques, ces animaux n'ont point réalisé de lésions tuberculeuses. Il était dès lors intéressant de rechercher s'ils n'avaient point bénéficié de cette intervention au point de vue de leur résistance à l'infection.

On inocule donc, 80 jours après le dernier repas virulent, à ces trois témoins (et aussi aux vaccinés dont nous retrouverons plus loin l'histoire) en même temps qu'à un sujet neuf, 2 milligrammes de bacilles bovins, par tête, dans la veine jugulaire. Le témoin de cette épreuve meurt de granulie en 35 jours. Les trois survivants, présumés vaccinés, sont sacrifiés 60 jours après l'é-

preuve intra-veineuse. Un seul d'entre eux présente quelques tubercules miliaires répartis dans les deux poumons; les deux autres sont totalement indemnes de toute lésion apparente, mais l'inoculation au cobaye de leurs ganglions trachéo-bronchiques révèle l'existence en ces organes de bacilles virulents (1).

Cette expérience indique nettement la possibilité de créer chez le bœuf, à l'aide d'ingestions bacillaires à doses calculées, un état très manifeste de résistance à l'infection tuberculeuse.

On ne pouvait songer toutefois à utiliser, dans des expériences ou applications pratiques de cet ordre, soit un bacille bovin, soit un bacille humain *pleinement virulents*. La mise en œuvre de tels produits conduirait en effet, en toute certitude, à une souillure grave des étables d'expérience par les déjections bacillaires des animaux, souillure redoutable à la fois pour le personnel agricole et pour les animaux.

Notre choix s'est donc porté, pour ces nouvelles expériences, sur le bacille équin précédemment étudié.

Tenant compte des données acquises sur la perméabilité aux germes de la muqueuse intestinale des jeunes sujets, *nous avons mis parallèlement en expérience de tout jeunes veaux et leurs mères* préalablement reconnues indemnes par l'épreuve de la tuberculine.

EXPÉRIENCE. — Six vaches bretonnes pleines sont entretenues au laboratoire et l'on attend leur accouchement. A mesure que se produisent les naissances, l'on vaccine le jeune animal à l'âge de deux jours et sa mère en même temps. Trois mois après cette première intervention, on procède pour tous deux à une seconde ingestion virulente effectuée dans les mêmes conditions que la première. La dose utilisée est, pour chaque intervention, de 20 centigrammes de bacilles pour les jeunes et de 50 centigrammes de bacilles pour leurs mères. Le vaccin est offert aux jeunes au biberon, émulsionné dans du lait; les adultes reçoivent les bacilles émulsionnés dans 3 litres d'eau et à l'aide de la sonde œsophagienne.

Epreuves par ingestion. — Quatre mois après la seconde vaccination, quatre vaches et leurs veaux, qui ne réagissent point à la tuberculine, et une vache et son veau neufs, témoins, reçoivent à la sonde œsophagienne, les adultes 20 centigrammes, les

(1) C'est cette expérience qu'a citée M. Roux lors de la présentation à l'Académie des Sciences de la première note de M.M. Calmette et Guérin sur la vaccination par les voies digestives. *C. R. Académie des Sciences*, 1906, T. CXLII, p. 1319-1323.

jeunes 10 centigrammes de bacilles bovins virulents finement émulsionnés dans 2 litres d'eau pour chacun d'eux.

Cinq mois après l'épreuve on sacrifie les deux témoins, les quatre adultes vaccinés et deux seulement des veaux vaccinés. Chez les témoins, l'autopsie établit la présence de multiples adénopathies tuberculeuses du mésentère; les ganglions annexes du poumon et les rétro-pharyngiens sont tuberculés. Les adultes vaccinés présentent des lésions aussi étendues, mais moins graves que celles des témoins. *Seuls, les deux veaux vaccinés semblent totalement indemnes;* cependant, l'inoculation au cobaye de la pulpe des ganglions bronchiques, mésentériques et rétro-pharyngiens établit la virulence de ces divers organes. Les deux veaux vaccinés survivants sont abattus deux mois plus tard, soit sept mois après l'épreuve; l'autopsie les révèle *totalement indemnes et l'inoculation au cobaye de leurs divers ganglions reste sans résultat.*

La vaccination par les voies digestives semble donc irréalisable chez les bovidés adultes. Par contre, l'opération est fructueuse pour les jeunes animaux, et il est à remarquer qu'en ce qui les concerne ce procédé d'intervention fournit des résultats supérieurs à ceux des essais de vaccination par voie veineuse. Nous avons en effet établi précédemment que les animaux traités par ce dernier procédé se comportent fort mal à l'épreuve de l'ingestion virulente. Faisons observer immédiatement que la résistance conférée, si satisfaisante en apparence, reste en fait limitée lorsqu'on soumet, comme dans l'expérience suivante, les animaux vaccinés, non plus à une seule ingestion virulente, mais bien à la contamination par contact avec des animaux porteurs de lésions ouvertes de tuberculose.

Epreuves par cohabitation. — Les deux vaches et leurs veaux vaccinés, comme il a été dit plus haut, qui ne sont point soumis aux épreuves expérimentales d'ingestion rapportées précédemment sont, à dater du quatrième mois qui suit la seconde vaccination, placés en contamination en même temps que cinq témoins, avec des bovins affectés de tuberculose pulmonaire ouverte. Tous ces sujets sont entretenus dans une étable laissée dans le plus malpropre état possible afin d'aggraver les conditions de l'épreuve. L'on a soin de placer les animaux très près les uns des autres; leur mangeoire est commune; chaque vacciné

est entouré de deux tuberculeux et, afin d'égaliser les chances de contamination, un roulement est périodiquement établi, entre tous les sujets.

Vaccinés et témoins sont soumis à une épreuve de tuberculine 104 jours après le début de la contamination. Seuls, les *cinq témoins réagissent*. Les vaccinés ne fournissent aucune réaction, ce qui d'ailleurs, n'est nullement démonstratif en ce qui les concerne (1). L'épreuve de la tuberculisation ne sera d'ailleurs plus renouvelée au cours de l'expérience afin d'éviter toute cause d'erreur. Deux témoins sont sacrifiés au huitième mois de l'épreuve; ils présentent des lésions importantes du poumon, de ses ganglions annexes et des rétro-pharyngiens. L'un des veaux vaccinés est sacrifié après un an de contamination; il est totalement indemne; ses ganglions bronchiques montrent à l'examen histologique des lésions spécifiques minimes, tout au début de leur évolution; des fragments de ces mêmes organes tuberculisent les cobayes inoculés. Par contre, l'une des vaches vaccinées, sacrifiée après 13 mois de contamination, est *totale-ment indemne* et ses ganglions, inoculés au cobaye, se montrent virulents. La seconde vache vaccinée est abattue après 23 mois de contamination et offre, sans lésions, des ganglions virulents pour le cobaye. Enfin, le dernier des veaux vaccinés, sacrifié après plus de deux années de contamination, est indemne lui aussi de toute lésion constituée macroscopiquement, mais fournit des *ganglions bronchiques altérés histologiquement et virulents pour le cobaye*. L'un des témoins survivants, abattu à ce moment, présente des lésions pulmonaires tuberculeuses massives et déjà ouvertes.

Lorsqu'on compare les résultats de cette expérience à ceux obtenus dans les essais de vaccination par voie veineuse, l'on ne peut que conclure à la supériorité de la vaccination *per os* qui assure une résistance marquée à une épreuve de contamination d'une sévérité vraiment exagérée. Il est à remarquer, en effet, que si l'on devait pratiquement user de la vaccination par les voies digestives, l'on prendrait soin d'éliminer tout d'abord des étables les sujets portant des lésions ouvertes de tuberculose.

C'est en ces conditions que nous avons entrepris, depuis deux

(1) Lignières a le premier démontré le peu de valeur de l'épreuve à la tuberculine chez les animaux qui ont fait l'objet de tentatives de vaccination. Seuls, les résultats positifs sont démonstratifs.

ans, de larges applications pratiques de la méthode. Après l'élimination des tuberculeux ouverts que compte l'étable, la vaccination est mise en œuvre, dès leur naissance, sur tous les nouveaux de l'exploitation. Jusqu'ici, les résultats obtenus paraissent satisfaisants, mais nous réservons nos conclusions sur ce point.

VACCINATION DOUBLE PAR VOIE VEINEUSE ET PAR LE TUBE DIGESTIF

Nous avons indiqué plus haut, au début de l'exposé de nos recherches sur la vaccination par les voies digestives, les conditions d'un essai portant sur 4 animaux vaccinés par inoculation intra-jugulaire (2^e série, 4 et 40 milligrammes) qui furent ensuite éprouvés par ingestion en même temps que 4 témoins. L'épreuve d'ingestion, réalisée par quatre repas bacillaires, fut effectuée par absorption spontanée au seau de la dilution virulente et non à la sonde œsophagienne. Nous rappelons l'insuccès de l'épreuve chez les témoins qui fit de cette expérience notre premier essai involontaire de vaccination *per os*.

Les animaux vaccinés, éprouvés ainsi, devenaient donc en fin de compte, des sujets *successivement vaccinés par voie veineuse et per os*.

Quatre-vingts jours après le dernier repas virulent, ces sujets et un témoin sont éprouvés par inoculation intra-veineuse de 2 milligrammes de bacille bovin virulent; le témoin meurt de granulie en 35 jours; les vaccinés restent en parfait état de santé et n'offrent à l'abatage pratiqué 5 mois après l'épreuve aucune lésion tuberculeuse. Chez tous cependant, des bacilles virulents, provenant de l'inoculation d'épreuve, sont mis en évidence par injection au cobaye de la pulpe des ganglions pulmonaires.

La double intervention vaccinante dont ces animaux ont fait l'objet, leur a donc conféré une résistance plus satisfaisante que celle enregistrée dans nos autres tentatives, sans que cependant l'on puisse dire qu'un résultat *complet* ait été obtenu.

DEUXIÈME PARTIE

Vaccination à l'aide de bacilles morts.

Dans toutes les expériences précédemment rapportées, nous avons pris soin, que les vaccinations aient été effectuées au labo-

ratoire ou dans des exploitations agricoles, d'isoler soigneusement, de mettre à l'abri de toute contamination les sujets en cours d'essais d'immunisation.

Il est aisé, en effet, de prévoir que durant la période d'immunisation, les sujets mis en expérience demeurent, sinon plus, tout au moins aussi sensibles à l'infection tuberculeuse que des animaux neufs. Il est donc indiqué de placer les sujets à vacciner en milieu indemne de toute contamination. L'expérience suivante ne laisse aucun doute sur ce point.

EXPÉRIENCE. — Six veaux nés, dans une exploitation gravement infectée, de mères tuberculeuses non affectées de lésions cliniquement décelables sont, dès leur naissance, séparés de leurs mères et placés dans une écurie désinfectée. On les soumet à l'âge de 15 jours à une épreuve de tuberculine, qui montre qu'ils sont indemnes; on les vaccine alors à leurs 1^{er} et 4^e mois à l'aide de 4 et 10 milligrammes de bacille équin. Ces animaux sont conduits à leurs mères pour chaque têtée et tout aussitôt remis dans leur étable désinfectée. Soumis à l'âge de 6 mois à une nouvelle épreuve de tuberculine, 2 d'entre eux réagissent; abattus, ils sont reconnus tuberculeux à l'autopsie. L'infection de ces sujets procède donc des très courts contacts qu'ils ont eus avec leur mère ou de l'allaitement.

L'isolement complet et l'alimentation au lait cuit ou au lait de vaches saines constituent donc des précautions accessoires indispensables de la mise en pratique de tout procédé de vaccination antituberculeuse.

Ces difficultés de mise en œuvre nous ont conduit à la recherche d'un procédé de vaccination qui, en conférant rapidement une résistance suffisante, permettrait d'éviter toute mesure par trop gênante d'isolement des sujets à vacciner.

Seul, l'emploi de bacilles tués, inertes et susceptibles d'une résorption rapide, pouvait répondre à cette indication.

Sur les conseils de M. Roux, qui depuis longtemps en avait étudié la facilité de résorption par l'organisme des animaux de laboratoire, nous avons tout d'abord utilisé dans nos recherches les bacilles iodés.

BACILLES IODÉS

Des ballons de cultures sur bouillon glycériné du bacille bovin très virulent qui nous sert de virus d'épreuve, âgées de 6 semaines, sont débarrassés du bouillon qu'ils contiennent. Le liquide est remplacé par de l'eau iodée à 1/400; le voile micro-

bien est dissocié par agitation et après une heure de contact environ, jeté sur un filtre, puis rapidement lavé à l'eau distillée stérilisée.

I. *Voie veineuse.* — Quatre bouvillons de 6 mois, indemnes de tuberculose, reçoivent dans la jugulaire, les uns (n°s 1 et 2) 200 milligrammes; les autres (n°s 3 et 4) 400 milligrammes chacun de bacilles iodés. Cette opération ne provoque aucun trouble.

Le n° 1 est éprouvé, en même temps qu'un témoin, 30 jours après la vaccination, par inoculation intra-veineuse de 3 milligrammes de bacille bovin. Il meurt de tuberculose en 33 jours; le témoin succombe en 35 jours.

Le n° 2 et un témoin sont éprouvés 18 jours après l'intervention par ingestion à la sonde de 10 centigrammes du même bacille bovin. Sacrifiés 80 jours plus tard, le vacciné est trouvé indemne de toute lésion apparente, tandis que son témoin présente de belles et multiples adénopathies mésentériques. Les ganglions mésentériques du sujet vacciné, inoculés à 6 cobayes, ne tuberculisent point ces animaux.

Les vaccinés 3 et 4 sont éprouvés, eux aussi, par ingestion à la sonde de 15 centigrammes de bacille bovin, en même temps que deux témoins, mais 93 jours seulement après la vaccination. Sacrifiés 148 jours plus tard, ils présentent, ainsi que les témoins, des lésions tuberculeuses de la chaîne mésentérique, sans qu'on puisse relever en faveur des vaccinés une différence appréciable dans l'importance des lésions constatées.

II. *Voies digestives.* — Nous avons réalisé avec des bacilles iodés une expérience de vaccination *per os* dans des conditions identiques à celles de l'essai d'immunisation à l'aide de bacilles vivants rapportée plus haut.

Trois vaches et leurs veaux reçoivent à deux reprises, à 60 jours d'intervalle, *per os*, les mères à la sonde, 50 centigrammes de bacilles iodés, les veaux dans leur biberon, 20 centigrammes des mêmes bacilles. Les veaux sont vaccinés pour la première fois à l'âge de 2 jours et leurs mères à ce même moment.

Quatre mois après la seconde vaccination, l'une des vaches et son veau, en même temps que deux témoins, reçoivent *per os*, les adultes 20 centigrammes, les jeunes 10 centigrammes de bacilles bovins virulents. Les animaux sont sacrifiés 5 mois plus tard; tous, vaccinés et témoins, offrent à l'autopsie de belles

lésions des ganglions rétro-pharyngiens et mésentériques.

Les quatre vaccinés (adultes et jeunes) survivants sont mis en contact avec des animaux tuberculeux, 4 mois après la vaccination, ainsi que des témoins et dans les conditions précédemment indiquées (page 595). Après une année de contamination, tous les animaux réagissent à la tuberculine; les vaccinés abattus présentent à l'autopsie des lésions très récentes de tuberculose pulmonaire et des tubercules calcifiés de leurs ganglions mésentériques.

L'on ne peut que conclure, de ces divers essais, à l'insuffisance de la vaccination par les bacilles iodés; ceux-ci se montrent, quelque soit le mode d'utilisation choisi pour leur emploi, inférieurs de beaucoup aux bacilles équins vivants.

BACILLES CHAUFFÉS

Une seule expérience a été réalisée avec des microbes modifiés par la chaleur. Elle a porté sur trois vaches et leurs veaux; des bacilles bovins, portés à 100° durant une minute, ont été employés comme vaccins et utilisés aux doses et dans les conditions indiquées dans l'expérience précitée de vaccination *per os*, à l'aide de bacilles iodés. Les épreuves de contrôle ont aussi été pratiquées de même façon et avec les mêmes témoins. Tous les vaccinés ont été trouvés tuberculeux à l'autopsie pratiquée, soit 5 mois après l'épreuve à la sonde, soit après une année de contamination.

BACILLES DÉGRAISSEZ

L'extrême facilité de résorption des bacilles dégraissés devait nous conduire à en tenter l'essai dans un but d'immunisation rapide. Nous avons utilisé des bacilles bovins dégraissés selon le procédé que nous avons fait connaître (dessiccation prolongée, dégraissage à froid par agitation dans le toluène ou l'éther de pétrole), bacilles dont le mode de dégraissage nous semble très indiqué pour de telles recherches (1).

Quatre bovins indemnes de tuberculose, âgés de moins de 4 mois, reçoivent dans la veine jugulaire une émulsion de bacilles dégraissés, savoir : les n°s 1 et 2 chacun 50 milligrammes à deux

(1) VALLÉS, Bacilles tuberculeux dégraissés. *C. R. de la Société de Biologie*, 1905. T. LX, p. 1020.

reprises à 20 jours d'intervalle, le n° 3, en une seule fois, 200 milligrammes; le n° 4, 400 milligrammes.

Les bovins n° 1 et 2 sont éprouvés un mois après la dernière inoculation, en même temps que deux témoins, par inoculation intra-veineuse de 2 milligrammes de bacille bovin. L'un des témoins meurt en 34, l'autre en 41 jours; tous deux présentent des lésions massives de granulie; sacrifiés 2 mois après l'épreuve, les vaccinés, qui sont en parfait état de santé, n'offrent, malgré l'extrême gravité de l'épreuve, que des lésions très limitées de tuberculose: quatre ou cinq tubercules, de la dimension d'une tête d'épingle, dans leurs ganglions bronchiques.

Les animaux n°s 3 et 4 sont, en même temps que deux témoins, éprouvés trois mois après la vaccination par ingestion à la sonde, de 15 centigrammes de bacilles bovins virulents. Tous ces sujets sont sacrifiés cinq mois plus tard; le bovin n° 3 (200 milligrammes de bacilles dégraissés) et les témoins offrent des lésions tuberculeuses de presque tous les ganglions de la chaîne mésentérique et des altérations des ganglions médiastinaux et trachéobronchiques. Le bovin n° 4 (400 milligrammes de bacilles dégraissés) présente pour toute lésion trois petits nodules calcifiés d'un ganglion mésentérique.

La résistance conférée par l'inoculation aux bovidés de quantités relativement élevées de bacilles tuberculeux dégraissés est donc insuffisante, et il ne nous a point paru indiqué d'étudier l'application pratique de leur emploi. Il est à remarquer, cependant, que les bacilles ainsi modifiés jouissent de propriétés plus nettes que celles des bacilles iodés, dont les qualités immunisantes par voie veineuse paraissent nulles.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Il est indiqué de recourir, dans les essais de vaccination antituberculeuse des bovidés, à l'emploi d'un bacille dépourvu de virulence pour ces animaux et qui soit susceptible d'une résorption assez rapide et complète.

Nous disposions pour nos recherches d'un bacille d'origine équine possédant ces qualités essentielles.

Les résultats obtenus par inoculation intra-veineuse de ce microbe, dans les conditions indiquées par von Behring pour

son Bovovaccin, sont comparables à ceux obtenus avec cette substance.

La résistance conférée par ce mode reste *très relative*. Elle est directement proportionnelle à la *quantité* des bacilles inoculés au titre vaccinant. Elle ne permet, en aucun cas, aux animaux de résister plus de quelques mois à l'infection naturelle. Elle est également insuffisante à assurer la *résorption complète* des bacilles bovins inoculés dans la veine jugulaire, à titre d'épreuve de l'immunité. Elle ne restreint pas l'aptitude des bovidés à l'infection expérimentale par le tube digestif.

La résistance conférée par inoculation sous-cutanée de ces mêmes bacilles, à des doses doubles de celles utilisées par voie veineuse, est de beaucoup inférieure à celle obtenue par inoculation intra-veineuse.

Il est possible de conférer aux bovidés soit par ingestion de petites doses de bacilles bovins virulents, soit par ingestion de doses élevées de bacilles presque avirulents, une *résistance très réelle* à l'infection par le tube digestif.

Il est indiqué d'utiliser dans la vaccination *per os* des bacilles assez peu virulents afin de ne pas provoquer une souillure dangereuse des étables par les bacilles vaccins que les vaccinés éliminent dans les jours qui suivent l'intervention.

La résistance conférée est d'autant plus nette que la vaccination *per os* a été pratiquée chez un animal plus jeune. Elle permet, à l'inverse de la vaccination par voie veineuse à l'aide des mêmes bacilles, la *résorption complète*, en 7 mois au maximum, des bacilles bovins virulents provenant d'un repas d'épreuve.

On peut considérer cette aptitude comme une manifestation d'immunité *purement locale*. Ces mêmes animaux ne se montrent, en effet, pas plus aptes que ceux vaccinés par voie veineuse à la résorption des bacilles bovins *inoculés dans la jugulaire*.

La vaccination *per os* ne met point les jeunes bovidés définitivement à l'abri de l'infection tuberculeuse. Elle leur permet toutefois de résister *durant un an environ* au contact étroit et permanent de bovidés porteurs de lésions ouvertes de tuberculose pulmonaire. Après deux années entières de contamination, en des conditions d'une extrême sévérité, les vaccinés ne présentent que des lésions insignifiantes ou occultes, tandis que les témoins, depuis de longs mois infectés, offrent, à cette époque, des

lésions massives de tuberculose pulmonaire ou abdominale.

La vaccination *per os* des jeunes bovidés mérite d'être étudiée pratiquement et utilisée dans les étables, de concert avec la recherche et l'élimination des tuberculeux porteurs de lésions ouvertes.

La vaccination des bovidés à l'aide de bacilles tués nous a fourni, quel que soit le mode choisi, des résultats nuls ou de beaucoup inférieurs à ceux obtenus avec des bacilles vivants.

Nous avons dit, au début de ce mémoire, tout ce que nous devons à notre maître, M. le Dr Roux. Qu'il nous soit permis de remercier, en terminant, tous ceux qui, par leur précieux concours ou leur rare désintéressement, ont facilité nos recherches. A l'initiative éclairée de M. Vassilliére, Directeur de l'agriculture, nous devons de précieux moyens de travail. M. Boulongne, vétérinaire départemental de l'Aisne, l'un des premiers et des plus ardents vulgarisateurs des vaccinations pastoriennes, s'est mis, dès le début de nos recherches, à notre entière disposition, ne ménageant ni sa peine, ni son temps. C'est à lui que nous devons d'avoir pu entreprendre de larges essais pratiques, chez MM. Poisson, Léguillette, Wateau, de Vivaise, Dazard, Brazier, qui tous ont consenti de gros sacrifices financiers; non contents de mettre leurs étables à notre disposition, certains d'entre eux sont allés jusqu'à acquérir des bovidés spécialement en vue des essais à entreprendre.

Nous exprimons aussi notre reconnaissance à MM. Gilbert et Ch. Balsan et à nos confrères MM. Rossignol père, Bonnet, Goulin, Nicodème, Picard et Jouanne, qui ont grandement facilité notre tâche.

Le mécanisme d'action des dérivés arsenicaux dans les trypanosomiases.

PAR C. LEVADITI

(Travail du Lab. de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

L'étude du mécanisme suivant lequel l'atoxyl et, en général, les dérivés arsenicaux à structure moléculaire complexe, agissent dans les infections à trypanosomes, est intéressante à plusieurs points de vue. Tout d'abord, en déterminant les conditions qui président à l'action thérapeutique de ces médicaments, elle peut faciliter la découverte de nouveaux composés plus actifs que ceux dont on dispose actuellement. En second lieu, il a été établi par les travaux d'Ehrlich et de ses collaborateurs que les trypanosomes, grâce à leurs facultés d'accommodation, acquièrent, sous l'influence du traitement atoxylé, une résistance parfois absolue à l'égard de l'atoxyl; ils deviennent immuns et leurs caractères acquis se transmettent indéfiniment d'une génération de parasites à l'autre. L'étude du mode d'action des dérivés atoxylés peut donc servir à résoudre ce problème d'immunité des êtres uni-cellulaires, ce qui n'est pas sans intérêt au point de vue du mécanisme, encore assez obscur, de la résistance acquise des animaux supérieurs.

A cela s'ajoute le fait, assez inattendu au premier abord, à savoir que l'atoxyl et les arsenicaux qui s'en rapprochent par leur constitution chimique, *tout en jouissant de propriétés curatives manifestes, sont dépourvus de toute action trypanocide appréciable dans le tube à essai.*

Ce sont là les principales raisons qui, dès 1907, nous ont déterminé à entreprendre l'étude de cette question. A la suite des

recherches d'Uhlenhuth, Gross et Bickel (1), auxquels on doit la découverte de l'action thérapeutique de l'atoxyl dans les spirilloses expérimentales, nous avons tenté de préciser, en collaboration avec Mc Intosh (2), le mécanisme suivant lequel l'arsanilate engendre la spirillolyse chez les animaux infectés par le *Spirillum gallinarum*. Plus tard, en juillet 1908, nous avons, avec Yamanouchi (3) et Brimont (4), étendu nos investigations au mode d'action de l'atoxyl dans les trypanosomiases. Ces dernières recherches nous ont conduit à déterminer l'influence exercée par les tissus animaux sur ce composé et sa transformation en un produit trypanocide, le *Trypanotoxyl*. Enfin, de nouvelles expériences (5) nous ont permis d'étudier la constitution du *Trypanotoxyl* et de formuler l'hypothèse de la transformation de l'atoxyl en une *toxalbumine arsénierée*, constituée par un noyau albumineux propre à l'organisme, servant de support à l'arsenic. Ce sont ces données que nous résumerons dans le présent mémoire.

I

Mesnil et Nicolle (6) ont été les premiers à attirer l'attention sur l'innocuité de l'atoxyl à l'égard des trypanosomes, *in vitro*. Ayant mélangé à du sang infecté une certaine quantité de ce dérivé (à l'état de poudre), ces auteurs ont constaté qu'il était dépourvu de toute action microbicide. De son côté, Uhlenhuth (7) et ses collaborateurs Gross et Bickel (8) ont fait la même constatation en ce qui concerne les spirochètes (*Spir. pallida*, *Spir. gallinarum*), et leurs recherches ont été confirmées par Levaditi, et Mc Intosh (*loc. cit.*). On s'est donc demandé quel pouvait être le mode d'action de ce médicament, si efficace lorsqu'on l'administre aux animaux infectés et pourtant totalement dépourvu

(1) UHLENHUTH, GROSS et BICKEL, *Deutsche mediz. Woch.*, 1907, n° 4.

(2) LEVADITI et MC INTOSH, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1907, p. 1090.

(3) LEVADITI et YAMANOUCHI, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1908, vol. LXV, p. 23.

(4) LEVADITI, YAMANOUCHI et BRIMONT, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1908, vol. LXV, p. 25.

(5) Ces expériences ont été résumées dans deux notes présentées l'une à la Société de Biologie (1909, vol. LXIV, n° 1, p. 33), l'autre à la Société de Pathologie exotique (*Bull. de la Soc. de Pathol. exotique*, 1909, vol. II, n° 1, p. 45).

(6) MESNIL et NICOLLE, *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1906, vol. XXII, p. 524.

(7) UHLENHUTH, *Deutsche militärärztl. Zeitschr.*, 1907; *Verein für in. Medizin, in Deutsche med. Woch.*, 1907, n° 30.

(8) UHLENHUTH, GROSS et BICKEL, *Deutsche med. Woch.*, 1907, n° 4.

de propriétés trypanocides et spirillicides appréciables dans le tube à essai. Pour ce qui a trait aux spirilloses, en particulier à la septicémie provoquée par le spirille de Marchoux et Salimbeni, Uhlenhuth, Gross, et Bickel et, indépendamment de ces auteurs, Levaditi et Mc Intosh ont établi que l'atoxyl engendre la destruction des parasites d'une façon indirecte, par l'intermédiaire de l'organisme animal. Ainsi, d'après L. et I., l'arsanilate modifie cet organisme, en ce sens qu'il rend l'infection légère, presque inappréciable, et qu'il provoque une crise précoce, analogue à celle qui met fin à l'infection naturelle. Il agit *en exagérant les moyens que l'animal emploie normalement pour se débarrasser des spirilles au cours de la crise*. Le même processus semble présider à la destruction du *Trepomema pallidum* chez les lapins atteints de kératite spécifique expérimentale, et soumis au traitement atoxylé. Levaditi et Yamanouchi (1) ont vu, à ce propos, que les tréponèmes subissent des altérations régressives *en dehors des cellules* et qu'ils finissent par disparaître de la cornée. Or, comme Uhlenhuth l'a établi le premier, et comme nous l'avons constaté à l'aide de l'examen à l'ultra-microscope, l'atoxyl n'est nullement toxique *in vitro* pour le spirochète de Schaudinn et Hoffmann. Force nous est de conclure que l'arsanilate de soude engendre la destruction du tréponème, non pas directement, à la façon d'un antiseptique, mais bien après avoir influencé l'organisme, ou encore après avoir subi une certaine transformation dans l'intimité des tissus.

Ces conclusions sont-elles applicables au mode d'action de l'atoxyl dans les infections causées par des trypanosomes? Les constatations de Mesnil et Nicolle, de même que celles d'Uhlenhuth (*loc. cit.*) ayant établi, comme nous l'avons déjà vu, que ce composé arsenical est inactif vis-à-vis des trypanosomes *in vitro*, laissaient prévoir que la trypanolyse devait être engendrée, chez l'animal infecté, non pas directement, mais bien suivant un procédé indirect, analogue à celui qui préside à la spirillolyse. Dans le cas des trypanosomes, comme dans celui des spirochètes, on peut formuler deux hypothèses à ce propos: D'après la première, l'atoxyl n'exerce *in vivo* aucune

(1) LEVADITI et YAMANOUCHI. *C. R. de la Société de Biologie*, 1908, vol. LXIV, p. 911.

action microbicide sur les flagellés pathogènes; il ne fait qu'exagérer les moyens de défense dont l'organisme dispose pour détruire plus ou moins rapidement, plus ou moins complètement ces flagellés (phagocytose et propriétés trypanocides du sérum). D'après la seconde, l'arsanilate de soude, tout en n'agissant pas d'une façon directe sur les trypanosomes, se transforme, chez l'animal vivant, en un dérivé, qui, lui, jouit de qualités trypanolytiques et représente le véritable agent destructeur des trypanosomes.

C'est Ehrlich (1) qui, le premier, a formulé d'une façon précise cette dernière hypothèse. Dans une conférence faite au *Congrès des dermatologistes allemands*, tenu à Francfort, ce savant a émis l'opinion que l'atoxyl, pareil en cela aux matières colorantes, subit une réduction de la part des tissus et se transforme en un composé réduit, lequel, contrairement à l'arsanilate, détruit activement les trypanosomes. Quelques recherches que nous avions entreprises antérieurement avec l'atoxyl dans la kératite syphilitique expérimentale du lapin, nous ayant montré que le sérum des animaux simplement atoxylés n'exerce aucun pouvoir curatif, lorsqu'on administre aux lapins syphilisés (2) (3), nous avaient également conduit à penser que, s'il y a transformation de l'atoxyl en un principe actif, spirillo-lytique ou trypanocide, ce principe ne doit pas se former dans le sang et y persister, mais bien dans l'intimité des tissus. Ces recherches, et aussi les faits énoncés par Ehrlich, nous ont déterminé, Yamanouchi et moi, à rechercher si, *in vitro*, les divers organes du lapin ne transforment pas l'atoxyl en une substance capable de détruire les flagellés pathogènes dans le tube à essai. L'expérience suivante montre qu'il en est réellement ainsi :

Exp. I. — Transformation de l'atoxyl en Trypanotoxyl sous l'influence de l'émulsion de foie de lapin.

On sacrifice un lapin par saignée et on recueille le foie en évitant de toucher à la vésicule biliaire. L'organe est tritiqué grossièrement dans un mortier stérile et suspendu dans 60 c. c. d'eau salée à 9/1000. On centrifuge rapidement la suspension, afin de la débarrasser des grosses particules; elle sert à préparer les mélanges suivants :

(1) EHRLICH, *Verhandl. der Deutsch. dermatolog. Gesellsch.*, X^e Congrès, 1908, p. 52.

(2) LEVADITI et YAMANOUCHI, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1908, vol. LXIV, p. 911.

(3) Mesnil et Marchoux, dans des recherches inédites, ont remarqué des faits analogues dans les trypanosomiases expérimentales.

(4) La solution, faite dans de l'eau salée, est chauffée pendant 15 minutes à 60°.

a) 4 c. c. d'émulsion de foie + 4 c. c. d'une sol. d'atoxyl à 4 0/0.
 b) 4 c. c. — — + 4 c. c. de sol. salée.
 c) 4 c. c. d'atoxyl à 4 0/0 + 4 c. c. — —

Les mélanges sont maintenus à 37° pendant 2 heures. On éprouve leur toxicité vis-à vis des trypanosomes, en procédant comme il suit : on verse dans de petits tubes à essai 12 gouttes de chaque mélange et 1 à 3 gouttes de sang défibriné, provenant d'une souris infectée par le tryp. du *Nagana* du *Togoland* (1). On observe le sort des trypanosomes en examinant, à des intervalles variables, une goutte de chaque mélange, entre lame et lamelle et à la temp. du laboratoire.

TABLEAU I

MÉLANGES	HUIT MINUTES	QUINZE MINUTES	UNE HEURE
<i>Foie + atoxyl.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Détruits.</i>
<i>Foie + sol. salée.</i>	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.
<i>Atoxyl + »</i>	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.

Cette expérience, répétée un très grand nombre de fois avec le même résultat, montre qu'à 37°, le foie transforme l'atoxyl en un produit qui tue les trypanosomes au bout de 5 à 8 minutes et qui les détruit complètement après 1 heure de contact. Bien entendu, les parasites conservent leur vitalité dans l'émulsion de foie et dans la solution d'atoxyl.

Le même phénomène se produit lorsque, au lieu de se servir de l'atoxyl, on emploie son dérivé acétylé, l'*arsacétine* de M. Ehr-

TABLEAU II (Exp. II).

DILUTION du mélange <i>foie + arsacétine</i>	APRÈS	
	15 minutes.	30 minutes.
Par.	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
1/10	Très mobiles.	<i>Immobiles.</i>
1/20	» »	<i>Immobiles p. c.</i>
1/40	» »	Mobiles.
1/80	» »	Très mobiles.

(1) Nous avons toujours employé le sang des souris infectées depuis la veille par inoculation intra-péritonéale de sang riche en trypanosomes. Recueillis à ce moment de l'infection, les parasites, en assez grand nombre, conservent plus longtemps leur vitalité *in vitro* que les flagellés recueillis à la fin de l'infection.

lich. En mettant en contact à 37°, pendant 3 heures, 4 c. c. de l'émulsion hépatique et 4 c. c. d'une solution d'arsacétine à 4 0/0, on constate que le mélange est devenu fortement trypanocide (v. tableau II).

Les trypanosomes ont conservé leur mobilité dans la solution d'arsacétine.

Quelles sont les conditions qui président à la formation du *Trypanotoxyl* aux dépens de l'atoxyl? Nous avons étudié, à ce propos, les points suivants :

Exp. III. — 1^o *Influence du temps de séjour à 37°.* On prépare 3 mélanges contenant chacun 4 c. c. d'émulsion hépatique et 4 c. c. d'une solution d'atoxyl à 4 0/0. De ces mélanges, le premier est maintenu à 37° pendant 2 heures, le second pendant 4 h. 1/2, le troisième pendant 26 heures. On apprécie le pouvoir trypanolytique vis-à-vis des tryp. du Nagana.

TABLEAU III

SOLUTIONS	2 HEURES A 37°	4 HEURES 1/2 A 37°	26 HEURES A 37°
Pur	<i>Détruits.</i>	<i>Détruits.</i>	<i>Détruits.</i>
1/10	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
1/20	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
1/40	<i>Immob. partielle.</i>	<i>Faibl. mobiles.</i>	<i>Mobiles.</i>
1/80	—	—	<i>Très mobiles.</i>
1/100	<i>Faibl. mobiles.</i>	<i>Mobiles.</i>	»
1/160	<i>Très mobiles.</i>	<i>Mobiles.</i>	»

Observation après une heure de contact.

L'expérience montre que la quantité de *Trypanotoxyl* formée au dépens de l'atoxyl n'augmente pas sensiblement après deux heures de séjour à 37°. Il y a donc un *optimum* d'action, au delà duquel le pouvoir trypanocide du mélange semble s'atténuer au lieu d'augmenter.

2^o **Exp. IV.** — *Influence du vide sur la formation du Trypanotoxyl.* On introduit 22 c. c. d'une émulsion hépatique et un volume égal d'une solution d'atoxyl à 4 0/0 dans un ballon stérile dans lequel on fait le vide. Un échantillon du même mélange est conservé dans un tube simplement bouché au

coton. Après un séjour de 2 heures et demie à 37° et de 20 heures à la temp. de la chambre, on apprécie le pouvoir trypanocide.

TABLEAU IV

SOLUTIONS	VIDE	TÉMOIN
Pur.	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
1/20	<i>Immobiles.</i>	<i>Immob. partielle.</i>
1/40	<i>Immobiles.</i>	"
1/80	<i>Immob. presque compl.</i>	Mobiles.
1/160	Mob. partielle.	Très mobiles.

Le vide facilite donc la transformation de l'atoxyl en Trypanotoxyl.

3° *Conservation du Trypanotoxyl.* Un mélange d'atoxyl et d'extrait hépatique, contenant du Trypanotoxyl, est conservé pendant 3 jours à la glacière. Mis en contact avec des trypanosomes du Nagana, il les immobilise au bout de 5 minutes. Le Trypanotoxyl ne semble donc pas s'atténuer sensiblement dans ces conditions.

Ces recherches montrent que *l'émulsion de foie transforme l'atoxyl en un produit qui immobilise les trypanosomes in vitro, et qui détermine, du moins à certaines concentrations, la destruction complète de ces parasites.* Il en résulte aussi que ce produit, le Trypanotoxyl, est plus actif lorsque la réaction s'opère dans le vide et que si, à la température de 38°, il perd une partie de son activité, par contre, il la conserve entièrement à la température de la glacière.

Le foie n'est pas le seul à transformer l'atoxyl en Trypanotoxyl. En effet, si les leucocytes, le rein, la moelle osseuse, la rate et le cerveau du lapin ont été inactifs, au contraire les muscles et surtout le poumon ont réalisé cette transformation. Ajoutons que le sérum de la même espèce animale, mélangé à une solution d'atoxyl, ne confère pas à cette dernière des qualités trypanocides. Quoi qu'il en soit, *c'est le foie (de lapin et de poule) qui s'est montré le plus actif à ce point de vue.*

Ayant souvent répété ces expériences avec des échantillons d'atoxyl de diverses provenances, nous nous sommes convaincu qu'elles réussissent toujours, à la condition d'employer

l'extrait de foie et la solution d'atoxyl dans des proportions *optima*, qui sont celles mentionnées dans les protocoles que nous venons d'exposer. Lorsque le mélange contient des quantités inférieures de l'un ou de l'autre de ces composants, on constate que le pouvoir trypanocide est nul, ou peu prononcé. Cela explique, à notre avis, les insuccès enregistrés par Friedberger (1), par Uhlenhuth et Woithe (2), et aussi par Breinl et Nierenstein (3), lesquels n'ont obtenu des mélanges actifs que d'une façon inconstante. La sensibilité de la race de trypanosomes dont on se sert pour apprécier l'activité du Trypanotoxyl peut également influencer le succès de l'expérience; on conçoit que si la quantité de Trypanotoxyl formée aux dépens de l'atoxyl est trop faible, on ne réussira à mettre en évidence les propriétés trypanocides du mélange que si l'on se sert d'une race de trypanosomes très sensible à l'atoxyl *in vivo*.

On sait que le pouvoir curatif de l'atoxyl, en ce qui concerne les infections à trypanosomes, peut varier d'une espèce animale à l'autre, voire même d'un individu à l'autre. Ehrlich a montré, à ce propos, que plus une souris est sensible à l'action毒ique d'un médicament arsenical donné, plus il est facile de la guérir d'une infection à trypanosomes, en lui administrant ce médicament. Nous nous sommes donc demandé si l'activité des tissus, en particulier du foie, par rapport à la transformation de l'atoxyl en Trypanotoxyl, ne varie pas elle aussi d'une espèce à l'autre. Dans ce cas, ces différences dans le pouvoir transformateur des organes expliquerait, jusqu'à un certain point, les variations de l'activité thérapeutique de l'arsanilate de soude.

Exp. V. — Transformation de l'atoxyl en Trypanotoxyl par le foie du lapin et de la souris. On recueille le foie (sans vésicule biliaire) chez onze souris et on en pèse 10 grammes; on pèse également 10 grammes de foie de lapin et on triture les organes, en ajoutant 35 c. c. d'eau salée. On mélange 4 c. c. de chacune de ces émulsions à 4 c. c. d'une solution d'atoxyl à 4 0/0 et on soumet le tout pendant 2 heures à 37°. Voici les résultats fournis par le titrage, au point de vue de l'activité trypanocide :

(1) FRIEDBERGER, *Berlin. klin. Woch.*, 1908, no 38, p. 1714.

(2) UHLENHUTH et WOITHE, *Arbeiten aus dem Kaiserlich. Gesundheitsamte*, 1908, vol. XXIX, p. 403.

(3) BREINL et NIERENSTEIN, *Zeitschr. für Immunitätsforschung*, 1909, vol. I, p. 260.

TABLEAU V

SOLUTION	FOIE LAPIN	FOIE SOURIS
Pure	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
1/10	<i>Idem.</i>	Très mobiles.
1/20	<i>Idem.</i>	"
1/40	<i>Mo^b. partielle.</i>	"
1/80	<i>Mobiles.</i>	"
— — — — —		
Après 30 minutes.		

Cette expérience montre que la quantité de Trypanotoxyl engendrée par le foie du lapin, dépasse sensiblement celle produite, dans les mêmes conditions, par le foie de la souris. *Le pouvoir transformateur des tissus peut donc varier d'une espèce animale à l'autre; ceci explique le fait que l'arsanilate agit différemment suivant l'espèce ou l'individu auquel on s'adresse.*

Si le pouvoir préventif et curatif de l'atoxyl et de l'arsacétine est réellement dû à l'action trypanocide du dérivé qui se forme lorsqu'on ajoute du foie à ces composés, on doit s'attendre à ce que les races de trypanosomes rendues artificiellement résistantes à l'arsanilate de soude, ne soient pas influencées *in vitro* par ce dérivé. Nous avons examiné cette question en collaboration avec Brimont et Yamanouchi (1), en nous servant de deux races résistantes créées par Mesnil et Brimont, et dont voici l'histoire :

La race *AR* provenait d'un cheval infecté avec du Surra de l'île Maurice et traité avec de l'atoxyl par le docteur Lafont (2). Elle était, au moment où nous fîmes l'expérience, à son 128^e pas-

(1) LEVADITI, BRIMONT et YAMANOUCHI, *C. R. de la Société de Biologie*, 1908, vol. LXV, p. 25.

(2) MESNIL et BRIMONT, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1908, vol. LXIV, p. 637.

sage sur la souris et résistait à la dose de 0,004 grammes d'atoxyl par animal.

La race *ARR* dérivait de la précédente et avait été renforcée par des injections répétées d'arsanilate, faites chez la souris. Elle était à son 52^e passage lors de l'expérience.

En outre, nous nous sommes servi d'une race de trypanosomes (espèce non déterminée) (1) résistante à l'atoxyl, fournie obligamment par M. le professeur Ehrlich, et que nous appellerons la race *R*.

Exp. VI. — Action du Trypanotoxyl sur les races de trypanosomes résistantes à l'atoxyl. On se sert d'un mélange de foie et d'atoxyl, contenant du Trypanotoxyl, que l'on fait agir à la dose de 12 gouttes pour une goutte de sang infecté, d'une part sur des trypanosomes *normaux* (Surra de l'Inde) et d'autre part sur la race *A R*, résistante à l'atoxyl.

TABLEAU VI

SOLUTION de trypanotoxyl corresp. à	RACE A. R.			RACE TÉMOIN		
	15 minutes	30 minutes.	1 heure 1/2	15 minutes.	30 minutes.	1 heure 1/2
Atoxyl 1/100	Tr. mob.	Mobiles.	Immob.	Immob.	Détruits.	Détruits.
» 1/200	»	»	Immob.	Part. imm.	Immob.	Détruits.
» 1/500	»	»	Mobiles.	»	Immob.	Immob.
» 1/1000	»	»	»	Rares imm.	Immob.	Immob.
» 1/2000	»	»	Tr. mob.	Tr. mob.	Immob.	Immob.

Il en résulte que les races de trypanosomes qui, dans l'organisme vivant, résistent à l'action thérapeutique de l'atoxyl, ne sont influencées que lentement et incomplètement *in vitro*, par le Trypanotoxyl; leur sensibilité vis-à-vis de ce produit est, en effet, soit nulle, soit de beaucoup inférieure à celle des races témoins. C'est surtout avec la race *R*, provenant du laboratoire de M. Ehrlich, que nous avons constaté cette insensibilité absolue à l'égard du Trypanotoxyl, ce qui, très probablement, s'explique par la résistance très prononcée que cette race montre *in vivo*. C'est là une

(1) Des expériences de trypanolyse *in vitro* et de fixation du complément, nous ont permis de différencier cette race du Nagana de Togoland et du Surra de l'Inde (Levaditi et Mutermilch).

preuve de plus de ce que l'atoxyl agit sur les trypanosomes après s'être transformé au contact des organes, en un produit trypanocide, le Trypanotoxyl.

* *

Par quels moyens les tissus animaux engendrent-ils la transformation de l'atoxyl en Trypanotoxyl? Des recherches faites en collaboration avec Yamanouchi nous ont montré que les cellules et les débris cellulaires ne sont pas indispensables à cette transformation, car l'émulsion hépatique, centrifugée ou filtrée sur papier, agit comme la suspension d'organe broyé. D'un autre côté, le principe actif de cette émulsion est insoluble dans l'alcool à 80°; un mélange d'atoxyl et d'extrait alcoolique de foie de lapin se montre, après un séjour de 2 heures à 37°, inactif vis-à-vis de trypanosomes, tandis que le précipité alcoolique, tout d'abord desséché, puis repris avec de l'eau salée, transforme l'arsanilat en son dérivé trypanocide. Ce principe actif, grâce auquel les organes rendent l'atoxyl toxique pour les flagellés pathogènes, est relativement *thermostable*. En effet, l'activité du foie ne subit qu'une faible atténuation après le chauffage de l'émulsion à 60° ou même à 100°. Plus encore, un fragment de glande hépatique, retiré immédiatement après avoir sacrifié l'animal, et projeté dans de l'eau bouillante, se montre presque aussi actif que le foie frais. Ajoutons que le glycogène pur et le glycose, employés seuls, de même que le glycose en présence de l'extrait inactif de rein, ne modifient nullement l'atoxyl *in vitro*.

Ayant ainsi éliminé l'intervention des lipoïdes solubles dans l'alcool, des sels et des pigments biliaires, du glycogène, du glycose et des fermentes hépatiques *thermolabiles*, nous nous sommes demandé si les propriétés de l'extrait du foie ne sont pas attribuables à ses qualités réductrices. Nous avons constaté que le pouvoir grâce auquel l'extrait hépatique (chauffé ou non chauffé) transforme l'atoxyl en Trypanotoxyl, et aussi l'activité de l'extrait et du précipité alcoolique, marchent de pair avec la force réductrice vis-à-vis du bleu de méthylène. Ainsi, pour ne donner qu'un exemple, le foie bouilli, qui transforme activement l'atoxyl en son dérivé trypanocide, réduit ce bleu à peu près comme le foie frais, tandis que l'extrait alcoolique, qui n'est pas réducteur, laisse intact ce sel arsenical.

Nous avons conclu de ces recherches que *dans la réaction qui a lieu lorsqu'on met en présence in vitro des extraits d'organes et de l'atoxyl ou de l'arsacétine, c'est le pouvoir réducteur de ces extraits qui joue le principal rôle*. Nous avons admis aussi que, *dans l'organisme vivant, c'est un processus réducteur analogue qui préside à la formation du principe trypanocide aux dépens de l'atoxyl injecté*. Nous avons, de la sorte, confirmé la théorie de la réduction formulée par M. Ehrlich et apporté des faits expérimentaux qui en ont démontré le bien fondé.

Depuis la publication de nos premières recherches, Friedberger (1) est venu lui aussi confirmer cette théorie, il est vrai à l'aide de faits d'un ordre moins biologique que les nôtres. Cet auteur a montré que *l'acide thioglycolique*, pareil en cela aux extraits d'organes, transforme, dans le tube à essai, l'atoxyl en un dérivé trypanocide, analogue au Trypanotoxyl. Or, il s'agit, dans l'espèce, d'une action chimique essentiellement réductrice. Ajoutons que, tout récemment, Breinl et Nierenstein (2) ont pu se convaincre, par des expériences analogues aux nôtres, de ce que la transformation de l'atoxyl en son dérivé trypanocide s'opère par voie de réduction; ils ont réalisé cette transformation, non seulement avec l'extrait hépatique, mais aussi avec une *réductase* isolée des levures (3). Toutefois, d'après ces observateurs, *l'oxydation* peut aboutir au même résultat; ils ont remarqué, en effet, que l'eau oxygénée et une oxydase isolée chimiquement, transformaient l'atoxyl en Trypanotoxyl dans le tube à essai.

II

Les recherches dont il vient d'être question se rapportent à l'action du Trypanotoxyl sur les trypanosomes, appréciée dans le tube à essai. Nous avons, de plus, entrepris des expériences concernant l'activité préventive ou thérapeutique de ce composé. Les voici :

(1) FRIEDBERGER, *Berlin, klin. Woch.*, 1908, p. 1714.

(2) BREINL et NIERENSTEIN, *Zeitschr. für Immunitätsforschung*, 1909, vol. I, p. 620.

(3) Des expériences antérieures à la publication de B. et N. nous ont montré que le pouvoir réducteur de bactéries (B. typhique) ne suffit pas pour réaliser la réduction de l'atoxyl *in vitro*.

a) Action du Trypanotoxyl en mélange avec des trypanosomes.

a) *Exp. VII.* — Un mélange actif *in vitro*, constitué par un volume d'émulsion de foie et un volume d'une solution d'atoxyl à 1 : 25, est dilué de moitié avec de l'eau physiologique, ce qui ramène à 1 : 100 la concentration de l'atoxyl. On verse dans plusieurs tubes des quantités décroissantes de ce mélange, on ramène le volume à 1 c. c. et on y introduit 0, 1 c. c. d'une dilution de sang de souris infectée avec des tryp. du Nagana du Togoland, sang préalablement dilué dans de l'eau salée. Après 1/2 heure de contact à la temp. de la chambre, on injecte chaque mélange dans le péritoine d'une souris. Une série témoin est faite avec une solution d'atoxyl au même titre (1 : 100).

TABLEAU VII. — *Trypanotoxyl.*

TABLEAU VIII. — *Atoxyl.*

En comparant ces deux tableaux, on voit que *l'activité du Trypanotoxyl est incomparablement supérieure à celle de l'atoxyl, lorsqu'on a soin de mélanger ces composés à des trypanosomes et d'injecter les mélanges dans le péritoine de souris*. Ce n'est là, d'ailleurs, qu'une confirmation de ce que le Trypanotoxyl jouit d'un pouvoir trypanocide marqué *in vitro*, tandis que l'atoxyl en est complètement dépourvu.

Que se passe-t-il lorsque l'injection du Trypanotoxyl et du virus est faite *en deux points séparés du corps*?]

b) *Action du Trypanotoxyl injecté séparément du virus.*

Exp. VIII. — L'expérience est disposée comme la précédente, avec cette différence que le sang trypanosomié (0,1 c. c.) est introduit sous la peau du ventre, et le Trypanotoxyl sous la peau du dos.

TABLEAU IX. — *Trypanotoxyl.*

SOLUTIONS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16 j.
0,4 : 1/100	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
0,3 : 1/100	t. r.	O	O	O	O	O	O	O	O	n. r.	—	n.	+			
0,2 : 1/100	t. r.	O	r.	n. r.	n. r.	n.	+									
0,1 : 1/100	t. r.	n.	+													
0,05 : 1/100	r.	n.	t. n.	t. n.	t. n.	+										
témoin.	r.	t. n.	+													

TABLEAU X. — *Atoxyl.*

SOLUTIONS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 jours.
0,4 : 1/100.	O	O	O	O	O	O	O	O	O	r.	—	n.	t. n.	+
0,3 : 1/100.	t. r.	O	O	O	O	O	O	O	O	n. r.	—	+		
0,2 : 1/100.	r.	n.	t. n.	+										
0,1 : 1/100.	n. r.	+												
0,05 : 1/100.	r.	t. n.	+											

Ces deux tableaux montrent que *lorsqu'on introduit le Trypanotoxyl et le virus en deux points séparés du corps, l'activité du premier est presque égale à celle de l'atoxyl employé dans les mêmes conditions et à des doses équivalentes*. Des recherches analogues, faites en administrant le dérivé trypanocide et l'atoxyl, non pas au moment même de l'inoculation du virus, mais le *lendemain*, ou deux jours après, nous ont permis de constater la même égalité du pouvoir thérapeutique des deux produits. *La supériorité du Trypanotoxyl sur l'atoxyl n'apparaît donc que lorsqu'il s'agit de mélanges faits in vitro, par conséquent lorsqu'on fait intervenir les propriétés trypanocides directes des deux composés.*

Ces données nous permettent de conclure que, *dans le mélange constitué par l'extrait d'organes réducteurs et l'atoxyl, une faible partie seulement de ce dernier se transforme, par voie de réduction, en son dérivé trypanolytique*; le reste persiste à l'état d'atoxyl et agit comme tel, lorsqu'on l'administre aux souris préalablement infectées. En effet, comme nous venons de le voir, un tel mélange se montre, au point de vue curatif, l'équivalent d'une solution d'atoxyl au même titre. C'est là, à notre avis, une constatation digne d'être retenue, car elle concorde avec ce que l'on sait de l'élimination de l'arsanilate chez les animaux soumis au traitement par l'atoxyl. Les recherches de Wedemann (1), de Croner et Seligmann (2), de Blumenthal

(1) WEDEMANN, *Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, 1908, vol. XXVIII, p. 585.
(2) CRONER et SELIGMANN, *Deutsche med. Woch.*, 1907.

et Jacoby (1), de Tendron (2) ont établi que plus de la moitié de l'arsenic injecté s'élimine par les urines et qu'une petite partie seulement est retenue par les tissus; c'est très probablement cette minime fraction d'atoxyl non éliminée qui, par voie de réduction, se transforme en Trypanotoxyl et qui assure la destruction des trypanosomes *in vivo*.

III

Les recherches que nous résumerons dans ce chapitre se rapportent à la *constitution du Trypanotoxyl*. Afin de préciser cette constitution, il était nécessaire de trouver un moyen capable de séparer le Trypanotoxyl de l'atoxyl en excès dans le mélange trypanocide formé par l'extrait d'organe et l'arsanilate. C'est la *précipitation par l'alcool absolu* qui nous a fourni ce moyen et qui nous a permis de retrouver dans le précipité alcoolique tout le Trypanotoxyl, dont nous avons pu étudier de la sorte la constitution et les propriétés.

Si on traite par trois volumes d'alcool absolu un mélange d'extrait de foie de lapin et d'atoxyl à 4 0/0, contenant une quantité appréciable de Trypanotoxyl, on obtient un précipité abondant, riche en matières protéiques. Ce précipité, lavé un grand nombre de fois avec 200 c. c. d'alcool à la même concentration, desséché dans le vide et repris par de l'eau salée isotonique, se montre actif à l'égard des trypanosomes du Nagana ou du Surra, qu'il immobilise au bout de 3 à 5 minutes *in vitro* et à la température de la chambre. Au contraire, l'extrait alcoolique obtenu après évaporation de l'alcool dans le vide à 60°, et redissous dans l'eau, est dépourvu de toute action trypanocide dans le tube à essai. Cet extrait contient tout l'excès d'atoxyl non transformé en Trypanotoxyl, comme le prouvent ses propriétés thérapeutiques pour les souris trypanosomiées. Nous nous sommes d'ailleurs assuré préalablement que l'atoxyl est parfaitement soluble dans l'alcool employé à la même concentration (3 volumes alcool absolu pour 1 volume d'une solution d'atoxyl à 2 0/0). *La précipitation par l'alcool*

(1) BLUMENTHÄL et JACOBY, *Biochem. Zeitschr.*, 1909, vol. XVI, fasc. 1, p. 20

(2) TENDRON, *Bull. de la Soc. de Pathol. exotique*, 1909, n° 3, p. 140.

aqueux permet donc de séparer l'atoxyl du Trypanotoxyl, le premier restant en solution, le second se retrouvant dans le précipité alcoolique riche en matières protéiques.

Voici les détails des expériences dont il vient d'être question.

Exp. IX. — Séparation du Trypanotoxyl. On verse dans un ballon stérile (a) 50 c. c. d'une émulsion de foie, préalablement centrifugée, et 50 c. c. d'une solution d'atoxyl à 40%. Un second ballon (b) reçoit un mélange à volumes égaux d'extrait hépatique et d'eau physiologique. Après 3 h. 30 de séjour à 37° et 18 heures à la temp. de la chambre, on apprécie le pouvoir trypanocide du liquide contenu dans les 2 ballons (tryp. du Nagana du Togoland) :

	5 minutes.
Mélange foie + atoxyl 10 gouttes + trypanosomes 1 goutte : Mélange foie + eau salée.....	Immobiles. : Très mobiles.

On ajoute à 96 c. c. du mélange a, 288 c. c. d'alcool absolu, en ayant soin de verser l'alcool par petites quantités; 48 c. c. du contenu du ballon b (témoin) sont mélangés à 144 c. c. d'alcool absolu. Après un séjour de 3 heures à 37°, on centrifuge et on recueille le premier alcool (*Alcool I*). Le précipité est lavé avec 300 c. c. d'alcool au même titre et l'alcool est recueilli après centrifugation (*Alcool II*). On répète le lavage une seconde fois et on obtient un troisième alcool (*Alcool III*). Finalement, le précipité est desséché à 37°, tandis que les trois alcools sont évaporés dans le vide à 60°.

On obtient de la sorte :

<i>Précipité alcoolique.</i> $P = 4^{sr},99.$	<i>Extraits alcooliques.</i>	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I. } P = 2^{sr},6. \\ \text{II. } P = 0^{sr},34. \\ \text{III. } P = 0^{sr},08. \end{array} \right.$
(desséché.)	(desséchés.)	

Le contenu du ballon b, témoin, subit le même traitement; on obtient 1^{sr},1 de précipité alcoolique pesé à l'état sec.

On triture dans un mortier d'agate 0^{sr},3 du précipité alcoolique a, et on ajoute 15 c. c. d'eau salée; après 2 heures de séjour à 37°, on centrifuge et on recueille le liquide surnageant. On opère de la même manière avec le précipité alcoolique témoin b. Quant aux extraits alcooliques, ils sont repris, les deux premiers avec 5 c. c. d'eau salée pour 0^{sr},1 de substance, le troisième avec 2 c. c. d'eau salée pour la totalité de l'extrait.

A). *Essais du pouvoir trypanocide in vitro.*

[10 gouttes pour 1 goutte de sang de souris trypanosomiée (Nagana)].

TABLEAU XI

NATURE DU PRODUIT		5 MINUTES	20 MINUTES	UNE HEURE
<i>Précipité.</i>	<i>Précipité alcoolique atoxylé.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immob. détr.</i>
	<i>Précipité alcoolique témoin.</i>	<i>Très mobiles</i>	<i>Très mobiles.</i>	<i>Très mobiles.</i>
<i>Extrait.</i>	<i>Extr. alcool. I.</i>	<i>Très mobiles</i>	<i>Très mobiles.</i>	<i>Très mobiles.</i>
	<i>— — II.</i>	<i>Très mobiles</i>	<i>Très mobiles.</i>	<i>Très mobiles.</i>
	<i>— — III.</i>	<i>Très mobiles</i>	<i>Très mobiles.</i>	<i>Très mobiles.</i>

Cette expérience montre que la plus grande partie, sinon la totalité du *Trypanotoxyl*, se trouve dans le précipité alcoolique.

B) Essai du pouvoir trypanocide *in vivo*.

a) Précipité alcooliques (mélanges).

Des quantités variables du liquide obtenu par extraction du précipité alcoolique, sont mélangés à 0,1 c. c. d'une dilution de sang de souris infectée; on ramène les mélanges à 1 c. c. et on les injecte sous la peau des souris.

TABLEAU XII

Substance injectée.	Quantités	1	2	3	4	5	6	7	8 jours
Précipité alcoolique atoxylé.	0,8	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
Précipité alcoolique.	0,8	r.	t. n.	+					
	0,3	t. r.	t. n.	+					
Témoin.	—	n. r.	t. n.	+					

b) *Précipité alcoolique. Action thérapeutique.*

Un lot de souris est tout d'abord infecté avec des tryp. du Nagana, puis, le lendemain, reçoit des quantités variables des mélanges employés dans l'expérience précédente.

TABLEAU XIII

Substance injectée.	Quantités.	1	2	3	4	5 ^e jour.
Précipité alcoolique atoxylé.	0,8	t. r.	n.	t. n.	+	
	0,6	t. r.	n.	t. n.	t. n.	+
	0,5	t. r.	n.	t. n.	+	
	0,3	r.	. n.	+		
	0,2	n.	t. n.	+		
Précipité alcoolique.	0,8	n.	+			
	0,3	n.	t. n.	+		
Témoin.	—	n.	+			
Témoin.	—	n.	+			

Les tableaux XII et XIII permettent de formuler les conclusions suivantes :

1^o *Le précipité alcoolique se comporte comme le Trypanotoxyl, en ce sens qu'il détruit les trypanosomes in vitro et rend le virus inactif pour les souris ;*

2^o *Tout en étant trypanocide dans le tube à essai, ce précipité ne jouit d'aucun pouvoir curatif, contrairement à l'atoxyl, qui, lui, est actif dans l'organisme vivant, et dépourvu de toute action parasiticide appréciable dans le tube à essai.*

Nous reviendrons plus loin sur cette particularité (V. chap. V).

c) *Extraits alcooliques. Action thérapeutique.*

Ayant vu, dans des expériences faites *in vitro* que les extraits alcooliques ne sont pas trypanocides, nous n'en avons étudié que les propriétés thérapeutiques (injection simultanée, en deux endroits différents).

TABLEAU XIV

SUBSTANCE injectée.	QUANTITÉS	1	2	3	4 jours.
Extrait I.	1,0	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
Extrait II.	1,0	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
Extrait III.	1,0	0	0	0	0
	0,5	0	r	n	+
Témoin.	—	tr.	n	(n.)	+

Ce tableau montre que l'alcool aqueux extrait presque tout l'atoxyl resté non transformé en Trypanotoxyl; injectés à des souris, les trois extraits alcooliques, et en particulier les deux premiers, exercent, en effet, une action curative manifeste, à des doses qui correspondent aux doses thérapeutiques d'arsanilate.

En résumé, ces recherches prouvent que l'emploi de l'alcool permet de séparer l'atoxyl du Trypanotoxyl; le dernier précipite en même temps que les matières protéiques de l'extrait hépatique, tandis que l'atoxyl non transformé en son dérivé trypanocide reste en solution dans l'alcool aqueux.

Parallèlement à ces recherches, nous avons entrepris, avec le concours de M. Bertrand, une série d'expériences ayant pour but l'étude de la distribution de l'arsenic dans les diverses préparations obtenues en faisant agir l'alcool sur les mélanges de foie et d'atoxyl. Nous nous sommes servis de la méthode indiquée par M. Bertrand (1), en ayant soin d'employer des réactifs absolument exempts d'As.

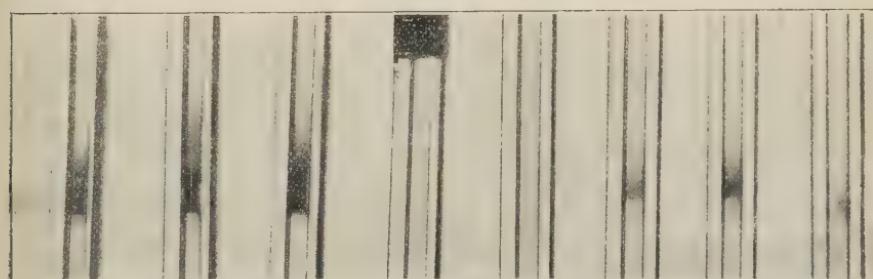
(1) BERTRAND, *Annales de Chimie et de Physique*, 1903, vol. XXIX, 7^e série, p. 4.

Exp. X. — Distribution de l'As. dans le précipité et l'extrait alcooliques.
 On ajoute à 40 c. c. d'une émulsion de foie de lapin, un volume égal d'une solution d'atoxyl à 4 0/0 et on laisse le mélange à 37°, pendant 5 heures. Après centrifugation, on ajoute 3 volumes d'alcool absolu et on laisse en contact pendant 3 heures à 37°. Le précipité est recueilli par centrifugation et lavé cinq fois avec 200 c. c. d'alcool à la même concentration. Finalement il est desséché à la temp. de l'étuve, tandis que le 5^e alcool de lavage est évaporé dans le vide à 60°. A ce moment, on recherche l'arsenic dans le produit obtenu par l'évaporation de ce cinquième alcool, de même que dans le précipité alcoolique lavé cinq fois :

Précipité alcoolique (0,1 gr.) = *bel anneau, corresp. à environ 0,0001 j. gr. As (v. fig 1, b).*

Cinquième alcool de lavage = *anneau faiblement gris.*

Fig. 4



a b c d e f g h

- a. — Arsenic, P = 0^{gr},0001.*
- b. — Arsenic dans le précipité alcoolique lavé cinq fois.*
- c. — Arsenic dans le précipité alcoolique lavé douze fois.*
- d. — Arsenic dans le 11^e alcool de lavage.*
- e. — Arsenic dans le 12^e alcool de lavage.*
- f. — Arsenic dans les hématies ayant été en contact avec la toxalbumine.!*
- g. — Arsenic dans les trypanosomes N ayant été en contact avec la toxalbumine.*
- h. — Arsenic dans les trypanosomes R ayant été en contact avec la toxalbumine.*

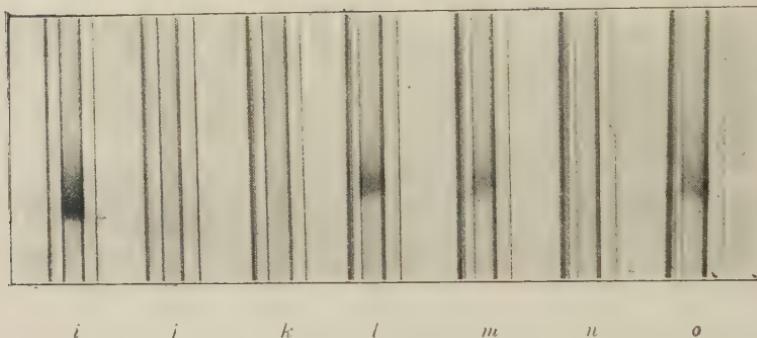
Une quantité appréciable d'*As*, correspondant environ à *un dixième de milligramme* pour 0^{gr},1 de substance sèche, existe donc dans le précipité alcoolique (soit 1 : 1000). Toutefois, le 5^e alcool de lavage contient encore une quantité sensible d'arsenic, ce qui prouve que ce lavage n'a pas été suffisant. On le répète, dans les mêmes conditions, 7 fois de suite ; on évapore le 11^e et le 12^e alcool et on dessèche le précipité lavé douze fois. Voici les résultats de la recherche de l'*As* :

Précipité alcoolique lavé 12 fois = *bel anneau correspondant à environ. (0,0001 gr. d'As; v. fig. 1 c.)*

Onzième et douzième alcools de lavage = *traces à peine perceptibles d'As (fig. 1, d et e).*

Cette expérience, plusieurs fois répétée, montre que les propriétés *trypanocides* du précipité alcoolique sont liées à la présence, dans ce précipité, d'une quantité assez considérable d'arsenic,

Fig. 2



i. — Arsenic dans la toxalbumine chauffée à 100° et débarrassée de matières protéiques.

j. — Arsenic dans le précipité obtenu après le chauffage de la toxalbumine à 100°.

k. — Arsenic dans la toxalbumine après le contact avec les *trypanosomes N*.

l. — Arsenic dans la toxalbumine.

m. — Arsenic dans les *trypanosomes N*, ayant été en contact avec la toxalbumine non chauffée.

n. — Arsenic dans les *trypanosomes N*, ayant été en contact avec la toxalbumine chauffée à 100°.

o. — Arsenic dans la toxalbumine chauffée, après le contact avec les *trypanosomes N* (à comparer avec fig. 1).

correspondant à environ 1 gramme pour 1000 de substance sèche. L'As est intimement lié aux matières protéiques qui forment ce précipité. En effet, en lavant une douzaine de fois le précipité avec de l'alcool aqueux, on constate qu'il ne s'appauvrit pas d'une façon appréciable en As et que, d'autre part, les derniers alcools de lavage n'en renferment que des traces insignifiantes.

IV

Ce sont ces données qui nous ont conduit à formuler l'hypothèse de la *toxalbumine arsénée*. Nous avons supposé que l'atoxyl, introduit dans l'organisme, commence par être réduit sous l'influence des propriétés réductrices des tissus animaux. Contrairement à l'arsanilate, le dérivé qui résulte de cette réduction jouit d'une affinité prononcée pour les matières protéiques des

organes qui le fabriquent et, en vertu de cette affinité, se combine chimiquement avec ces matières. De cette combinaison entre le noyau protéique propre à l'animal qui reçoit de l'atoxyl d'une part, et le dérivé réduit d'autre part, il résulte une toxalbumine arsénierée, dont voici les principaux caractères :

1^o *Elle renferme à la fois un noyau protéique et de l'arsenic intimement lié à ce noyau ;*

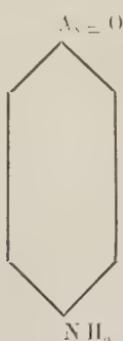
2^o *Elle jouit d'une affinité intense, d'une part pour les trypanosomes, et d'autre part pour les éléments cellulaires de l'organisme qui l'élabore ;*

3^o *Grâce à cette affinité, elle se fixe sur les trypanosomes et sur les cellules ; sa fixation sur les flagellés engendre leur destruction et assure les effets thérapeutiques de l'atoxyl ; d'autre part, en se fixant sur les éléments cellulaires, la toxalbumine se comporte comme un poison et provoque les phénomènes toxiques qui caractérisent l'intoxication par l'arsenilate ;*

4^o *Elle est relativement thermolabile, se détruisant en partie, ou même en totalité à la température de 100° ;*

5^o *Elle dialyse difficilement à travers les membranes en collodion.*

Quant au produit de réduction qui, après s'être combiné aux matières protéiques des organes, forme la toxalbumine arsénierée, nous le considérons comme très probablement identique au paraminophenylarsénoxyd, obtenu chimiquement par Ehrlich et Bertheim (1) en réduisant l'atoxyl, et dont voici la formule :



Ce produit, dont la toxicité est extrêmement prononcée et

(1) EHRLICH, *Ueber den jetzigen Stand der Chemotherapie, Bericht. der deutscher chemischen Gesellsch.*, 1909, vol. XLII, fasc. 1, p. 11.

qui jouit d'un pouvoir trypanocide très accusé *in vitro*, offre, d'après Ehrlich, une avidité marquée non seulement pour les trypanosomes, mais aussi pour les éléments cellulaires; il doit cette avidité à la présence de l'arsenic trivalent dans sa molécule. Or, d'après nous, c'est en vertu de la même avidité que le *paraminophenylarsénoxyd* se combine avec les matières protéiques des organes pour constituer la *toxalbumine arsénierée*. Nous résumons dans ce qui suit les expériences qui nous ont conduit à formuler l'hypothèse de l'albumine toxique arsénierée :

Exp. XI. — *Présence des matières protéiques dans le Trypanotoxyl isolé par la précipitation alcoolique.*

0,2 grammes de poudre, obtenue par précipitation alcoolique d'un mélange d'extrait hépatique et d'atoxyl, est trituré finement dans un mortier en agate et repris par 10 c. c. d'eau salée isotonique. Après un séjour de 2 heures à 37°, on centrifuge et on essaye le pouvoir trypanocide de l'extrait sur des tryp. du Nagana : ce pouvoir est des plus accusés. L'analyse chimique permet de retrouver dans cet extrait une quantité appréciable d'*As* (v. fig. 2, *l*).

D'autre part, on recherche l'albumine par le chauffage, par l'action des acides etc; l'examen permet de déceler des matières protéiques coagulables par la chaleur en quantité assez marquée.

Il en résulte que la *toxalbumine arsénierée* renferme, en même temps que de l'arsenic, des substances albuminoïdes propres à l'organisme qui l'élabore au détriment de l'atoxyl.

Exp. XII. — *Thermolabilité de la toxalbumine arsénierée.* L'extrait préparé en ajoutant 15 c. c. d'eau salée à 0 gr, 3 de précipité alcoolique desséché, et en centrifugeant après un séjour de 3 heures à 37°, est divisé en 2 parties *a* et *b*; *a* sert comme témoin, *b* est chauffé pendant 15 minutes à 100°, en tube fermé à la flamme. Il se forme un précipité, dont on se débarrasse par centrifugation. On essaie le pouvoir trypanocide de *a* et *b* sur des tryp. du Nagana (10 gouttes pour 1 goutte de sang de souris infectée la veille) :

	APRÈS 5 minutes	APRÈS 2 heures 1/2.
<i>Toxalbumine témoin a.....</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
— <i>chauffée à 100 degrés b...</i>	<i>Très mobiles.</i>	<i>Très mobiles.</i>

Cette expérience montre que le chauffage à 100° pendant

15 minutes détruit les propriétés trypanocides de la toxalbumine arsénier. Toutefois, dans d'autres recherches, nous avons constaté que la température de 50° ne fait qu'atténuer l'activité de cette toxalbumine et qu'il faut la porter pendant assez long-temps à 100° pour en détruire complètement la toxicité pour les trypanosomes. Il est intéressant de voir que la *précipitation totale des matières protéiques entraîne une perte notable dans la force parasiticide de la toxalbumine arsénier, sinon une complète disparition de ses qualités toxiques.*

Exp. XIII. — Dialyse de la toxalbumine arsénier. On verse 7 c. c. 5 d'une solution de toxalbumine arsénier dans un sac en collodion; le sac est placé dans un flacon contenant 500 c. c. d'eau distillée. Le troisième jour, on recueille le liquide contenu dans le sac et on l'évapore dans le vide sur de l'acide sulfurique. Le résidu est repris avec 5 c. c. d'eau salée et maintenu pendant 2 h. 1/2 à 37°. On apprécie le pouvoir trypanocide vis-à-vis de trypanosomes du Nagana, en employant, comme contrôle, un extrait de poudre alcoolique de foie normal, placé dans les mêmes conditions.

	5 MINUTES	1 HEURE.
Toxalbumine dialysée	Immobiles.	Immobiles.
Extrait de foie normal	Très mobiles.	Très mobiles.

Cette expérience montre que la toxalbumine arsénier ne dialyse pas, ou ne dialyse que très difficilement à travers les dialyseurs en collodion, puisque la solution placée dans le sac conserve son activité presque inaltérée. Cela prouve que la combinaison entre le noyau protéique et l'arsenic est non facilement dissociable, du moins dans les conditions où nous nous sommes placés (dialyse).

Ces faits nous ont conduit à admettre que l'arsenic, probablement sous la forme du dérivé réduit de l'atoxyl, entre en combinaison avec certaines matières protéiques propres à l'organisme, pour constituer un composé nouveau, analogue aux toxalbumines d'origine animale et végétale bien connues. Ce composé est spécifique, en ce sens que, grâce au noyau protéique qu'il renferme, il acquiert les caractères propres des albuminoïdes de l'espèce animale qui l'élabore aux dépens de l'atoxyl. Ainsi, la toxalbumine fabriquée par le lapin diffère de

celle produite par l'organisme de la *souris*; on sait, en effet, à la suite des études sur les précipitines et sur le phénomène de la fixation du complément, que les matières protéiques d'une espèce animale donnée diffèrent de celles d'une autre espèce même très voisine. En outre, la spécificité de la toxalbumine tient à la quantité d'*As* combiné au noyau protéique. Des expériences entreprises dans cette voie nous ont montré que la toxalbumine préparée avec le foie de la souris est non seulement moins active *in vitro* que celle obtenue avec le foie du lapin (v. exp. V), mais encore elle renferme une quantité d'arsenic sensiblement inférieure à celle de cette dernière. On peut donc concevoir de la façon suivante le schéma des *toxalbumines arsénierées* élaborées par l'organisme de la souris et par celui du lapin :

Noyau protéique — souris + As.

Noyau protéique — lap. + n (As).

Nous reviendrons plus loin sur cette question de la spécificité de la *toxalbumine arsénierée*.

V

Propriétés de la TOXALBUMINE ARSÉNIÉE : son mode d'action. La toxalbumine préparée avec le foie du lapin se conserve longtemps à la température de la glacière. Après 10 jours de séjour, nous l'avons trouvée encore toxique pour les trypanosomes *in vitro*. D'un autre côté, nous avons constaté que le précipité alcoolique, une fois épuisé par l'eau salée, ne cède pas en totalité le principe actif qu'il renferme; on peut, en effet, obtenir un liquide trypanocide actif lors d'une seconde et même d'une troisième extraction par l'eau salée.

Comment se comporte la toxalbumine arsénierée à l'égard des variétés de trypanosomes résistantes à l'atoxyxyl? Nous avons étudié cette question en nous servant de la variété fournie par M. Ehrlich (résistante à l'atoxyl *in vivo*, chez la souris), et nous avons constaté que l'activité de l'albumine toxique à l'égard de ces trypanosomes, appréciée dans le tube à essai, est très faible, sinon tout à fait nulle. En voici un exemple :

Exp. XIV. — On suspend 0^{gr}, 1 de poudre d'un précipité alcoolique à avé 6^e fois, dans 5 c. c. d'eau salée; après 2 heures de séjour à 37°, on centri-

fuge et on essaie le pouvoir trypanocide du liquide surnageant d'une part sur les trypanosomes du Nagana, et d'autre part sur la variété résistante de M. Ehrlich.

TABLEAU XV

RACES de trypanosomes.	IMMÉDIAT.	5 MINUTES	30 MINUTES	1 HEURE
Normale.....	Immobile.	Immobile.	Immobile.	Immobile.
Résistante à l'atoxyl	Très mobiles.	Mobiles.	Mob'les	Mobiles; rares; immobiles.

Cette expérience, montrant que la *toxalbumine arsénierée* est pour ainsi dire, totalement inactive *in vitro* vis-à-vis des trypanosomes résistants à l'atoxyl, prouve bien que la trypanolyse réalisée par l'atoxyl dans l'organisme vivant est provoquée réellement par cette *toxalbumine*.

* *

Les recherches que nous résumerons dans ce qui suit se rapportent au *mode d'action de la toxalbumine arsénierée dans l'organisme*. Étant donné qu'il s'agit d'un produit dont la toxicité pour les trypanosomes, appréciée dans le tube à essai, est des plus prononcée, nous avions pensé, au premier abord, que ce produit devait jouir d'un pouvoir curatif au moins égal à celui de l'atoxyl. Or, comme nous l'avons constaté dans l'expérience IX, la *toxalbumine*, tout en stérilisant le virus en mélanges faits *in vitro*, est totalement dépourvue de propriétés thérapeutiques. Ce fait, en apparence paradoxal, trouve son explication dans la façon dont la *toxalbumine arsénierée* se comporte vis-à-vis des cellules de l'organisme qui l'élabore aux dépens de l'atoxyl. En effet, *elle est toxique non seulement pour les trypanosomes, mais aussi pour ces éléments cellulaires*; en outre, elle offre une affinité marquée pour ces éléments, grâce à laquelle elle se fixe sur eux, tout comme elle s'attache aux trypanosomes. Plus encore, il ressort de nos recherches que, du moins pour ce qui concerne la *toxalbumine arsénierée* préparée artificiellement,

son avidité est plus marquée pour les éléments cellulaires que pour les trypanosomes circulants; *introduite dans l'organisme d'une souris trypanosomiée, par exemple, elle est rapidement et totalement absorbée par les éléments anatomiques, de sorte qu'il n'en reste plus de disponible en circulation pouvant agir sur les parasites.* De là l'inactivité thérapeutique de la toxalbumine arsénier. Voici les faits qui viennent à l'appui de notre façon de voir :

Exp. XV.—Action de la toxalbumine sur les spermatozoïdes du cobaye et du lapin. Même préparation que dans l'expérience IX. On mélange 10 gouttes de la solution de toxalbumine à 2 gouttes d'une émulsion de spermatozoïdes de lapin ou de cobaye. (Observation à la temp. du laboratoire.)

TABLEAU XVI. — *Spermatozoïdes de lapin.*

NATURE DU PRODUIT	IMMÉDIATEMENT.	HUIT MINUTES	23 MINUTES
<i>Toxalbumine ars.</i>	Très mobiles.	<i>Beaucoup immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
<i>Extrait de foie normal.</i>	Très mobiles	Très mobiles.	Très mobiles.

TABLEAU XVII. — *Spermatozoïdes de cobaye.*

NATURE DU PRODUIT	CINQ MINUTES	DIX MINUTES
<i>Toxalbumine ars.</i>	<i>Presque tous immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>
<i>Extrait de foie normal.</i>	Très mobiles.	Très mobiles.

La toxalbumine se montre donc toxique non seulement pour les spermatozoïdes d'une espèce animale étrangère, mais aussi pour ceux de l'espèce qui la fabrique aux dépens de l'atoxyl. Sa toxicité est liée à sa fixation sur le stroma des éléments cellulaires; ainsi, elle est absorbée par les éléments hépatiques, par les globules rouges homologues et hétérologues, et aussi, ce qui s'entend, par les trypanosomes sensibles à l'atoxyl. Nous avons pu nous assurer de cette fixation par des expériences faites dans le tube à essai, et aussi par la recherche de l'arsenic.

Exp. XVI. — Fixation de la toxalbumine sur les cellules hépatiques. On recueille le foie (sans vésicule biliaire) chez 3 souris; après trituration, on le suspend dans 4 c. c. d'eau salée isotonique et on centrifuge. 0 gr.2 de précipité alcoolique arsénié est émulsionné dans 10 c. c. d'eau salée, maintenus pendant 2 heures à 37° et centrifugé. On prépare les mélanges suivants :

- 1° 20 gouttes d'émulsion hépatique + 4 c. c. de toxalbumine;
- 2° 20 gouttes d'eau salée + —

Après 2 heures de séjour à 37°, on centrifuge le premier mélange et on essaye le pouvoir trypanocide et spermatocide du liquide clair et du mélange contrôle.

TABLEAU XVIII

SUBSTANCE employée	Immédiat	10 min.	30 min.	1 heure	5 min.	15 min.	30 min.	1 heure
Toxalbumine témoin (2°).	Immob.	Immob.	Immob.	Immob.	Presque tous immob.	Immob.	Immob.	Immob.
Toxalbumine + foie (1°).	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.				
Témoin : Eau salée.	»	»	»	»	»	»	»	»

Trypanosomes.

Spermatozoïdes de cobaye.

L'expérience montre que la toxalbumine arsénierée, mise en présence des cellules hépatiques, perd sa toxicité pour les trypanosomes et les spermatozoïdes; elle se fixe intimement sur ces cellules.

Exp. XVII. — Fixation de la toxalbumine arsénierée sur les globules rouges. On mélange 2 c. c. de toxalbumine à 18 gouttes de :

- 1° Sang de lapin défibriné;
- 2° Sang de lapin défibriné et lavé plusieurs fois;
- 3° Sérum de lapin;
- 4° Globules rouges de rat;
- 5° Sérum de rat.

Après 1 h 1/2 de séjour à 37°, on centrifuge et on essaye le pouvoir trypanocide des liquides sur les tryp. du Nagana.

TABLEAU XIX

Substance employée.	5 minutes.	15 minutes.	2 heures.	4 heures.
Tox alb. témoin.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.
Tox alb. + sang lapin.	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.
Tox alb. + hémat. lapin	» »	» »	» »	» »
Tox alb. + sér. de lapin.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.
Tox alb. + hémat. de rat.	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.
Tox alb. + sér. de rat.	» »	» »	» »	» »
Eau salée.	» »	» »	» »	» »

Il en résulte que *non seulement les hématies de lapin, mais aussi celles d'une espèce animale étrangère (rat), fixent la toxalbumine arsénierée préparée in vitro en partant de l'atoxyl et du foie de lapin. Le sérum sanguin ne jouit d'aucun pouvoir neutralisant vis-à-vis de cette toxalbumine.*

Dans une autre série d'expériences, nous avons recherché si la fixation de la toxalbumine sur les hématies homologues ou hétérologues est liée à l'absorption de l'arsenic par le stroma de ces globules. Pour ce faire, nous avons mélangé à 2 c. c. de sang de lapin, centrifugé et lavé, 4 c. c. de toxalbumine et, après un séjour des mélanges à 37°, nous avons examiné le pouvoir trypanocide du liquide et nous avons recherché l'arsenic dans les hématies (procédé de M. Bertrand). Nous avons constaté : 1^o que la toxalbumine, après avoir été en contact avec les globules rouges, avait perdu ses propriétés toxiques pour les trypanosomes; 2^o que les hématies contenaient une quantité d'As correspondant à environ à 0,00005 milligrammes (voir fig. 1, f).

Il en résulte que *la fixation de la toxalbumine arsénierée sur les hématies s'accompagne d'une absorption de l'arsenic par ces hématies.*

Exp. XVIII. — Fixation de la toxalbumine arsénier sur les leucocytes.
 Des leucocytes de cobaye, obtenus en injectant dans la cavité péritonéale 10 c. c. d'un mélange de bouillon et d'eau salée, sont lavés, puis suspendus dans de l'eau salée. D'autre part, on prépare des hématies de cobaye, que l'on lave plusieurs fois. On ajoute à 2 c. c. de toxalbumine des quantités variables de leucocytes et de globules rouges. On maintient les mélanges pendant 2 heures à 37°, on centrifuge et on essaye le pouvoir trypanocide du liquide.

TABLEAU XX

SUBSTANCE employée.	10 MINUTES	30 MINUTES	1 HEURE
2 c. c. toxalb. + 3 gouttes leucocytes.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.
2 c. c. toxalb. + 10 gouttes leucocytes.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.
2 c. c. toxalb. + 3 gouttes hématies.	Mobiles.	Faiblement mobiles.	Faiblement mobiles.
2 c. c. toxalb. + 10 gouttes hématies.	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.
2 c. c. toxalb. + 10 gouttes eau salée.	Immobiles.	Immobiles.	Immobiles.

On peut conclure de cette expérience que, contrairement aux hématies, les leucocytes ne fixent presque pas la toxalbumine arsénier.

* * *

Ces constatations nous permettent de concevoir de la façon suivante le mécanisme suivant lequel l'atoxyl et l'arsacétine agissent chez les animaux trypanosomiés :

Introduits dans l'organisme, ces produits commencent par être réduits par les tissus et transformés en dérivés (très probablement le paraminophenylarsénoxyd pour l'atoxyl) qui entrent en combinaison avec ces matières protéiques. Il en résulte la formation d'une toxalbumine arsénier, formée par un noyau

protéique combiné à l'arsenic, laquelle offre une avidité prononcée non seulement pour les trypanosomes, mais aussi pour les cellules de l'organisme même qui l'élabore aux dépens de l'atoxyl ou de l'arsacétine. Le résultat définitif, au point de vue de la destruction des trypanosomes, dépend, en dernier lieu, de la répartition de la toxalbumine entre les parasites d'une part, et les tissus d'autre part. Aussi, lorsqu'on administre la toxalbumine préparée *in vitro* à des animaux infectés, elle est intimement absorbée et fixée par les cellules, de sorte qu'il n'en reste qu'une quantité disponible insuffisante pour agir efficacement sur les parasites. De là l'inaktivité de la toxalbumine injectée *in vivo*. Il n'en est pas de même lorsque cette toxalbumine est élaborée dans l'organisme même, aux dépens de l'atoxyl ou de l'arsacétine. Dans ce cas, *elle agit sur les trypanosomes à l'état naissant, au niveau même des organes, et au fur et à mesure que ces organes la fabriquent au détriment des composés arsenicaux*. Avant qu'elle se fixe sur les cellules, elle est absorbée par les flagellés circulants, les tue et assure ainsi la guérison plus ou moins définitive de l'animal. On comprend ainsi pourquoi l'atoxyl, comme l'ont montré les recherches de Mesnil, jouit d'un pouvoir préventif relativement peu accusé, ne dépassant pas un délai de 24 heures. C'est que, dans ce cas, la toxalbumine arsénierée, avant qu'elle puisse exercer ses propriétés nocives sur les trypanosomes, est fixée par les éléments cellulaires et retenue par ces éléments.

VI

Nos recherches nous ont permis de préciser le mécanisme de l'immunité des races de trypanosomes rendues artificiellement résistantes à l'atoxyl. Cette immunité des parasites accoutumés à l'action毒ique du dérivé trypanocide de l'arsanilate, la toxalbumine arsénierée, peut être due soit au fait que ces parasites ont perdu leur faculté de fixer ce dérivé, soit à ce qu'ils ont acquis un véritable pouvoir antitoxique à l'égard de la toxalbumine. Dans le premier cas, il s'agit d'un état réfractaire attribuable à une perte des propriétés fixatrices vis-à-vis du poison; dans le second, d'une neutralisation du poison après son absorption par le protoplasma des trypanosomes. Afin de préciser lequel

de ces deux mécanismes préside à l'immunité des flagellés résistant à l'atoxyl, nous avons examiné leur pouvoir fixateur vis-à-vis de la toxalbumine et de l'arsenic, par comparaison avec les mêmes propriétés des trypanosomes normaux, non résistants à l'arsanilate. Voici le résultat de nos expériences :

Exp. XIX. — Fixation de la toxalbumine arsénier sur les trypanosomes normaux (N) et sur les trypanosomes résistants à l'atoxyl (R). Trois gros rats sont inoculés par injection péritonéale avec des trypanosomes du Nagana (N); on infecte au même moment 3 autres animaux de la même espèce avec des trypanosomes résistant à l'atoxyl R (race de M. le Professeur Ehrlich). Les rats sont sacrifiés le 3^e jour de l'infection, le sang de chaque groupe est défibriné, additionné de son volume d'eau salée et centrifugé dans des tubes étroits (5 millimètres). On recueille la couche de trypanosomes et on lave une fois les parasites avec de l'eau salée isotonique. On prépare les mélanges suivants :

1,5 c. c. de la solution de toxalbumine	+	10 gouttes de <i>tryp. N.</i>
1,5 c. c.	—	— + 10 gouttes de <i>tryp. R.</i>
1,5 c. c.	—	— + 10 gouttes d'eau salée.

On maintient les mélanges pendant 1 h. 1/2 à 37°, on centrifuge et on essaye le pouvoir trypanocide des liquides vis-à-vis des *tryp.* du Nagana.

TABLEAU XXI

LIQUIDE	15 minutes.	1 heure et 1/2.	2 heures
<i>Toxalbumine.</i> + <i>tryp. N.</i>	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.
<i>Toxalbumine.</i> + <i>tryp. R.</i>	Très mobiles.	Très mobiles.	Très mobiles.
<i>Toxalb. témoin.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>	<i>Immobiles.</i>

Cette expérience montre que les trypanosomes résistants à l'atoxyl n'ont nullement perdu la propriété de fixer la toxalbumine arsénierée; tout comme les trypanosomes sensibles à l'arsanilate, ces parasites réfractaires enlèvent à la toxalbumine ses qualités trypanocides. Toutefois, dans d'autres recherches disposées de la même manière, nous avons constaté que si les flagellés résistants absorbent la toxalbumine, leur pouvoir fixa-

teur est relativement inférieur à celui des parasites normaux.

Nous en avons la preuve dans le tableau suivant :

TABLEAU XXII

LIQUIDE	5 minutes.	15 minutes.	30 minutes.	55 minutes.	1 heure 3/4.	2 heures 1/2
<i>Toxalbumine + Tryp. N.</i>	Très mob.	Très mob.	Très mob.	Très mob.	Très mob.	Très mob.
<i>Toxalbumine + Tryp. R.</i>	»	»	Ass. faibl. mobiles.	Mobilité faible.	Mobilité faible.	Immob.
<i>Toxalbumine témoin.</i>	Immob.	Immob.	Immob.	Immob.	Immob.	Immob.

Or, la recherche de l'arsenic confirme les constatations précédentes. Elle montre que les trypanosomes R, quoique résistants à l'atoxyl in vivo, n'ont pas perdu la faculté d'absorber l'As contenu dans la toxalbumine arsénierée; leur pouvoir fixateur à l'égard de l'arsenic est, toutefois, sensiblement inférieur à celui des parasites témoins N. L'analyse chimique a été faite sur des trypanosomes N et R recueillis par centrifugation, après avoir été maintenus en contact avec une solution de toxalbumine arsénierée; les résultats sont représentés dans la fig. 1, g et h.

Ces recherches nous permettent de conclure que l'immunité antiarsénicale des races de trypanosomes rendues artificiellement résistantes à l'atoxyl, n'est pas liée à une perte *absolue* du pouvoir fixateur vis-à-vis de la *toxalbumine* et de l'arsenic qu'elle renferme. Ces parasites réfractaires absorbent le poison, quoique d'une façon moins accentuée que les flagellés sensibles. S'ils résistent à l'action nocive de ce poison, c'est que peut-être, tout en le fixant, ils le neutralisent au moyen de quelque *anti-poison* contenu dans leur protoplasma. Nous avons essayé de vérifier cette hypothèse, en recherchant s'il n'était pas possible d'extraire du corps des trypanosomes une substance capable de neutraliser la toxalbumine arsénierée. Nous avons constaté, à ce propos, que l'extrait aqueux de trypanosomes R (résistants), mélangé *in vitro* à une dose donnée de

toxalbumine, rend cette dernière inoffensive vis-à-vis des parasites *N* (sensibles). Le protoplasma des flagellés résistant à l'atoxyl contient donc bien un principe se comportant comme un anti-poison à l'égard du dérivé actif de l'atoxyl. Seulement, dans des expériences de contrôle, faites avec des trypanosomes normaux (*N*), nous avons trouvé que ces derniers parasites cèdent aussi à l'eau salée un anti-poison comparable au précédent. La différence, à ce point de vue, entre les deux races *N* et *R*, ne peut donc être que quantitative et non qualitative. Or, lorsqu'il s'agit de mesurer le pouvoir neutralisant des extraits des deux variétés sensible et insensible de flagellés pathogènes, on se heurte à des difficultés expérimentales pour ainsi dire insurmontables. Tout ce que nous sommes en droit d'affirmer, d'après ces recherches, c'est que *les trypanosomes résistants à l'atoxyl fixent la toxalbumine arsénierée et l'As qu'elle contient, qu'ils les fixent moins fortement que les trypanosomes sensibles à l'arsanilate et que leur protoplasma contient des principes solubles capables de neutraliser les propriétés trypanocides de cette toxalbumine*. Rappelons que ces résultats sont d'accord avec l'opinion d'Ehrlich (*loc. cit.*) concernant la façon dont se comportent les trypanosomes *N* et *R* vis-à-vis du paramino-phenylarsénoxyd.

* *

Nos recherches nous ont permis de saisir *la raison d'être du phénomène de la variabilité de la résistance à l'atoxyl suivant l'espèce animale*. Voici en quoi consiste ce phénomène : lorsqu'on rend une race de trypanosomes résistante à l'atoxyl chez la souris, par exemple, *il se peut que cette race perde son immunité antiarsenicale lorsqu'on la fait passer par l'organisme du rat*. Le fait a été observé par Mesnil (1), et indépendamment de ce savant, par Breinl et Nierenstein (2) et par Moore, Nierenstein et Todd (3); Ehrlich (4) en avait pris connaissance dès 1907, par une lettre de Breinl de Liverpool. Toutefois, il ne s'agit pas là d'une règle générale, ne souffrant pas d'exception; en effet,

(1) MESNIL et BRIMONT, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1908, vol. LXIV, p. 637.

(2) BREINL et NIERENSTEIN, *Deutsche med. Woch.*, 1908, n° 27, p. 1181.

(3) MOORE, NIERENSTEIN et TODD, *Ann. of tropic. medic.*, 1908, vol. II, n° 3.

(4) In ROEHL, *Berliner klin. Woch.*, 1909, n° 11.

Mesnil, d'une part, Ehrlich (1) et Roehl (*loc. cit.*) d'autre part, ont vu qu'une race résistante pour une espèce animale, peut également conserver son état réfractaire pour plusieurs autres espèces.

Or, étant donné que la substance toxique vis-à-vis de laquelle s'immunisent les trypanosomes, la *toxalbumine arsénier* possède une constitution complexe, et qu'elle renferme à la fois un noyau protéique spécifique pour chaque espèce animale et de l'*As*, on peut concevoir que l'état réfractaire puisse être dirigé non seulement contre l'*As*, mais aussi contre ce noyau protéique. Comme ce dernier est différent chez le rat et chez la souris, on comprend comment une race de trypanosomes, vaccinée contre le complexe :

Albumine-souris + As.

puisse ne plus l'être à l'égard du complexe :

Albumine-rat + n (As).

De cette façon, la spécificité de la résistance à l'atoxyl suivant l'espèce animale nous apparaît liée aux caractères propres du noyau protéique qui entre dans la constitution de la toxalbumine arsénier. Mais ce n'est pas là l'unique cause du phénomène en question. Comme on le remarque en examinant le schéma précédent, les caractères particuliers de la toxalbumine arsénier élaborée par une espèce animale donnée tiennent non seulement au noyau protéique spécifique de cette espèce, mais aussi à la quantité d'*As* combinée à ce noyau. Il en résulte qu'une race de trypanosomes rendue réfractaire vis-à-vis d'un complexe protéo-arsenical contenant une quantité d'arsenic égale à *n (As)*, le sera forcément contre un autre complexe dont le noyau albuminoïde, tout en étant différent du premier, sera combiné à une quantité d'arsenic égale à *As*. Il s'agit, dans ce cas, d'une *immunité absolue*, correspondant aux exceptions à la règle observées par Mesnil, Ehrlich et Roehl.

(1) EHRLICH, *Berlin. klin. Woch.*, 1907.

VII

Nous examinerons une dernière question, celle du *rôle des matières protéiques dans la molécule de toxalbumine arsénierée*.

Nous avons vu que lorsqu'on porte cette toxalbumine à la température de 100°, elle perd en grande partie ses qualités trypanocides. Comme, dans ces conditions, il se forme un abondant précipité albumineux que l'on élimine par centrifugation, nous avons pensé que cette inactivation pouvait tenir à ce que l'arsenic, se trouvant entraîné par l'albumine coagulée, est mis ainsi en impossibilité d'agir. Or, l'expérience n'a pas confirmé cette hypothèse.

Exp. XX. — Action de la chaleur sur la toxalbumine arsénierée. On suspend 0,3 grammes de précipité alcoolique dans 15 c. c. d'eau salée et on maintient le mélange à 37° pendant 3 heures. Après centrifugation, on divise le liquide en 2 portions *a* et *b*; *a* sert comme témoin, *b* est chauffé à 100° pendant 25 minutes. Il se forme un précipité albumineux, que l'on recueille par centrifugation et que l'on lave une fois. Le titrage du pouvoir trypanocide (tryp. du Nagana) montre, qu'après le chauffage, le liquide a perdu complètement ses propriétés toxiques. On cherche la présence de l'arsenic d'une part dans le précipité obtenu par la chaleur, d'autre part dans le liquide chauffé. Dans le premier on ne décèle pas la moindre trace d'*As*, tandis que le liquide contient presque autant d'arsenic qu'il y en avait dans la toxalbumine avant le chauffage (v. fig. 2, *i*).

On peut conclure de cette expérience que l'inactivation de la toxalbumine par le chauffage n'est pas due à un entraînement de l'arsenic par le précipité de matières protéiques qui se forme dans ces conditions. *La toxalbumine portée à 100° et débarrassée par centrifugation de ce précipité continue à contenir de l'As, et cependant elle est devenue totalement inactive, ou très faiblement toxique pour les trypanosomes.* En absence du noyau albuminoïde, l'arsenic est donc incapable d'agir sur les parasites, ce qui permet de supposer que ce noyau doit servir à fixer l'*As* sur les trypanosomes ou sur les éléments cellulaires. Il semble jouer, dans ce cas particulier, le rôle que joue l'*ambocepteur hémolytique* dans l'absorption de complément par les hématies sensibles à cet ambocepteur, ou bien celui de l'*oxydase* dans l'action du manganèse sur certains composés organiques

(Bertrand). Nous avons soumis cette hypothèse au contrôle de l'expérience et voici les résultats que nous avons obtenus :

Exp. XXI. — Rôle du noyau protéique dans la fixation de l'arsenic sur les éléments sensibles à la toxalbumine arsénierée.

On chauffe à 100° pendant 15 minutes une portion de toxalbumine et on élimine par la centrifugation le précipité formé; le liquide a totalement perdu son pouvoir trypanocide. On fait les mélanges suivants, en se servant de trypanosomes N (du rat), centrifugés et lavés :

a) 3 c. c. de *toxalbumine non chauffée* + 30 gouttes de *trypanosomes*,^{*}
 b) 3 c. c. — — — *chauffée* — — —

On maintient a et b pendant 2 heures à 37°, on centrifuge et on recueille à part les trypanosomes, que l'on dessèche au bain-marie. On apprécie le pouvoir trypanocide des liquides.

TABLEAU XXIII

LIQUIDES EMPLOYÉS	5 MINUTES	20 MINUTES	2 HEURES
<i>Toxalbumine pure.</i>	<i>Immob.</i>	<i>Immob.</i>	<i>Immob.</i>
<i>Toxalbumine 100°.</i>	Très mob.	Très mob.	Très mob.
<i>Toxalbumine non chauffée + Trypanosomes</i>	»	»	»
<i>Toxalbumine chauffée + Trypanosomes.</i>	»	»	»

Cette première recherche montre :

1^o *Que la toxalbumine a perdu ses propriétés trypanocides après le chauffage à 100°;*

2^o *Qu'elle a été totalement fixée par les trypanosomes N.*

On procède alors à la recherche de l'arsenic d'une part dans la toxalbumine non chauffée et chauffée, de même que dans la toxalbumine ayant été en contact avec les trypanosomes, et d'autre part dans les trypanosomes isolés par centrifugation. Voici les résultats obtenus :

- 1^o *Toxalbumine non chauffée = Anneau manifeste (fig. 2, l);*
- 2^o *Toxalbumine chauffée à 100° = Anneau manifeste;*
- 3^o *Toxalbumine non chauffée ayant été en contact avec les tryp. = Anneau très faible (fig. 2, k);*
- 4^o *Toxalbumine chauffée à 100° ayant été en contact avec les trypanosomes = Anneau manifeste (fig. 2, o);*
- 5^o *Trypanosomes ayant été en contact avec la toxalbumine non chauffée*

= Anneau manifeste (fig. 2, *m*);
 6° Trypanosomes ayant été en contact avec la toxalbumine chauffée à 100° = Pas d'*As* (fig. 2, *n*).

Ces résultats montrent que les trypanosomes, mis en présence de la toxalbumine débarrassée par la chaleur de son composé protéique, n'absorbent pas l'arsenic, tandis qu'ils fixent l'*As* lorsqu'ils ont été en contact avec la toxalbumine non chauffée, contenant son noyau albuminoïde.

Il en ressort que dans le complexe *albumine + As*, les matières protéiques servent à faciliter la fixation de l'arsenic sur les éléments sensibles à l'influence toxique de la toxalbumine arsénierée. Par analogie avec le mécanisme d'action du complément et de l'ambocepteur, nous admettons que l'arsenic, équivalent au complément, agit faiblement sur les trypanosomes ou les cellules, en absence des matières protéiques; ces dernières, intervenant comme l'ambocepteur, facilitent la fixation de l'arsenic sur ces trypanosomes et assurent, de la sorte, la destruction intense et rapide des parasites dans l'organisme infecté.

CONCLUSIONS

Certains composés arsenicaux à constitution complexe (atoxyl et arsacétine) subissent dans l'organisme des transformations aboutissant, après réduction préalable, à la substitution de l'arsenic dans la molécule de matière protéique. Il se forme, dans ces conditions, des toxalbumines arsénierées, lesquelles peuvent être spécifiques pour chaque espèce animale, leur spécificité étant liée d'une part au noyau protéique, et d'autre part à la quantité d'*As* substitué. Ces toxalbumines sont toxiques non seulement pour les éléments cellulaires de l'organisme qui les élabore, mais aussi pour les trypanosomes qui infectent cet organisme (1).

(1) Des recherches parallèles faites avec l'acide arsénieux nous ont montré que, du moins pour ce qui concerne sa fixation sur les trypanosomes et les cellules, cet acide se comporte différemment de la toxalbumine arsénierée et du trypanotoxyl.

N. B. — Dans un travail publié récemment, M. Roehl, du laboratoire de M. Ehrlich, a apporté quelques objections à notre théorie de la toxalbumine arsénierée; nous les avons discutées et réfutées dans une note parue dans les *C. R. de la Soc. de Biologie*. (ROEHL, Berlin. *klin. Woch.*, 1909, n° 11, p. 494. LEVADITI, *C. R. de la Soc. de Biologie*, vol. LXVI, p. 492.)

La rage⁽¹⁾ et le traitement antirabique à Constantinople.

PAR LE DR P. REMLINGER

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR OTTOMAN

On évalue à 60 ou à 80,000 le nombre des *chiens de rue* de Constantinople. Il meurt tous les jours une centaine de ces animaux, déficit bien vite comblé par un nombre au moins égal de naissances. La liberté dont jouissent les *chiens errants* est absolue. Elle n'est limitée que par certaines contraintes qu'ils s'imposent à eux-mêmes. Les *mordeurs* sont, de temps à autre, sur les constatations des agents de police ou, plus souvent, sur la dénonciation de leurs victimes, tués ou mis en observation à la fourrière municipale. Il n'est pris aucune mesure à l'égard des animaux *mordus* ou *roulés*. Malgré cette absence à peu près complète de police sanitaire, la rage chez les chiens de rue est extrêmement rare. Cette rareté est prouvée d'une part par le petit nombre d'habitants de Constantinople qui subissent chaque année le traitement pasteurien :

	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	Total
Constantinople et environs...	430	496	198	240	159	224	286	157	1590 (23,35 0/0)
Provinces.....	442	534	696	835	650	649	571	821	5218 (76,64 0/0)
	572	750	894	1075	809	873	857	978	6808

(1) La première partie de ce travail a fait l'objet d'une communication à la *Société Centrale de médecine vétérinaire*, à la séance du 1^{er} avril 1909. Ce nous est un agréable devoir de remercier notre dévoué collaborateur, le Dr Haïm Nam Effendi, du concours assidu qu'il nous a prêté tant pour la Direction de l'Institut antirabique que pour l'établissement de nos statistiques.

D'autre part, par le chiffre très restreint des animaux apportés à la fourrière. Il y a là un problème fort curieux et qui, depuis longtemps, excite l'intérêt du monde médical et du public en général.

La première idée qui se présente est que les chiens de rue jouissent à l'égard de la rage d'un degré plus ou moins complet d'immunité. On sait les différences énormes qui existent entre les diverses races de chiens au point de vue de leur réceptivité à certaines maladies infectieuses, au charbon, à la morve, par exemple. Ici, il n'en est pas de même. Nous avons inoculé, dans des buts très divers, plusieurs centaines de chiens de rue. Ces inoculations ont été pratiquées avec de nombreux virus, et par toutes les voies possibles. Nous n'avons jamais, au cours de ces recherches, observé de résistance particulière à l'égard du virus rabique. Nous avons du reste inoculé comparativement, dans des conditions rigoureusement identiques, un lot de chiens de rue de Constantinople et un lot de chiens de laboratoire expédié de Vienne. La proportion des survies et des atteintes s'est montrée, dans les deux cas, absolument la même...

Une opinion très répandue, — et que nous avons malheureusement, sur des impressions de promeneur et des renseignements vétérinaires erronés, contribué tout d'abord à propager (1) — est que la rareté de la rage chez les chiens de rue est due à une large prédominance de la forme paralytique. Cependant, nous avions été surpris de constater que, lorsqu'on inocule ces animaux avec du virus de rue, ils contractent la rage furieuse, au moins aussi fréquemment que la rage paralytique, et nous concevions mal comment un même virus aboutissait — suivant qu'il était inoculé dans la rue ou au laboratoire, — à deux formes cliniques si dissemblables. Chargé du service de la fourrière au mois de novembre 1907, nos doutes au sujet de la prédominance de la rage paralytique à Constantinople sont vite devenus une certitude. Sur 49 chiens enragés qui nous ont été apportés du 15 novembre 1907 au 15 novembre 1908 :

23 ont présenté une rage furieuse typique, demeurée pure jusqu'à la mort 13 fois; terminée par quelques phénomènes paralytiques, 10 fois;

(1) P. REMLINGER, La rareté de la rage à Constantinople : *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, 20 avril 1903.

14 ont présenté une forme paralytique pure, sans symptômes de fureur;

9 ont montré une forme mixte, mi-furieuse, mi-paralytique. Il était très difficile, au moment de l'examen, de se prononcer pour l'une ou l'autre de ces deux formes. Ces animaux n'étaient pas observés dès le début de la maladie. Dans ces conditions, il est très probable que l'excitation avait précédé la paralysie et que, par conséquent, ces cas doivent ressortir à la rage furieuse;

3 ont présenté une rage atypique (forme méningitique; forme cachectique).

Il ressort de ces chiffres que la rage furieuse est environ deux fois plus fréquente chez les chiens de rue que la rage paralytique. *Or cette proportion est supérieure à celle qui est notée à Paris chez les chiens enragés apportés à la fourrière municipale.* Il résulte en effet des renseignements qui nous ont été très aimablement donnés par M. Martel que, de 1896 à 1908, 172 chiens atteints de rage ont été admis à la fourrière parisienne. 79 fois, il s'agissait de formes mixtes, mal définies, difficiles à classer; 40 fois de forme furieuse; 53 fois de forme paralytique. Peut-être ce dernier chiffre est-il un peu trop fort. Le vétérinaire sanitaire n'assiste pas toujours à l'apparition des premiers symptômes, et les animaux peuvent avoir eu la rage furieuse avant d'être conduits à la fourrière en état de paralysie... Même en tenant compte de cette cause d'erreur, la rage paralytique paraît moins fréquente à Constantinople qu'à Paris, et il est impossible, par conséquent, de chercher de ce côté la cause de la rareté de la rage chez les chiens de rue.

Et maintenant le problème se complique d'un facteur très inattendu : c'est que, furieux ou paralytique, le virus de rue de Constantinople a presque toujours une virulence supérieure à la normale. C'est un *virus renforcé*. Nous avons inoculé sous la dure-mère ou dans la chambre antérieure du lapin le bulbe de 37 chiens enragés. Le tableau suivant donne pour chacun d'eux la forme de rage dont il était atteint, le mode d'inoculation employé et la durée d'incubation de la maladie chez le lapin.

N° d'ordre.	Nature du chien.	Forme de rage présentée.	Mode d'inoculation employé.	Durée de l'incubation. C. In. intra-cérébrale. O. In. intra-oculaire.
1	Jeune chien de rue.	Paralytique.	Cerveau.	12 (C) - 13 (C).
2	Bouledogue.	Apporté mort.	Cerveau.	13 (C) - 14 (C).
3	Chien de rue.	Furieux.	Cerveau et œil.	12 (C) - 15 (O).
4	Chien de rue.	Furieux.	Cerveau.	13 (C).
5	Chien de rue.	Furieux.	Cerveau et œil.	14 (C) - 19 (O).
6	Chien de rue.	Furieux.	Œil.	15 (O).
7	Chien de rue.	Paralytique.	Cerveau et œil.	12 (C) - 12 (O) - 25 (O).
8	Chien de rue.	Furieux.	Œil.	16 (O).
9	Chien de rue.	Furieux.	Cerveau.	13 (C).
10	Chien de rue.	Furieux.	Cerveau et œil.	13 (C) - 16 (O).
11	Jeune chien de chasse	Furieux.	Œil.	13 (O).
12	Chien de rue.	?	Cerveau et œil.	14 (C) - 15 (O).
13	Chien de rue.	Apporté mort.	Œil.	13 (O) - 14 (O).
14	Jeune chien de rue.	Furieux puis paral.	Cerveau et œil.	12 (C) - 21 (O).
15	Chien de rne.	Furieux.	Œil.	14 (O) - 17 (O).
16	Chien de rue.	Furieux.	Œil.	17 (O) - 20 (O).
17	Jeune chien de rue.	Furieux.	Œil.	29 (O) - 39 (O).
18	Chien de rue.	Paralytique.	Cerveau et œil.	13 (C) - 18 (O).
19	Chien de rue.	Furieux.	Œil.	12 (O) - 13 (O).
20	Chien de rue.	Paralytique.	Cerveau.	14 (C).
21	Jeune chien de rue.	Furieux.	Cerveau et œil.	12 (C) - 26 (O).
22	Chien de rue.	Paralytique.	Œil.	17 (O).
23	Jeune chien de rue.	Furieux.	Œil.	11 (O) - 15 (O).
24	Chien de rue.	Furieux.	Œil.	15 (O).
25	Jeune chien de rue.	Furieux puis paral.	Cerveau et œil.	10 (C) - 17 (O).
26	Chien de rue.	Furieux.	Œil.	13 (O) - 13 (O).
27	Chien de rue.	Furieux puis paral.	Œil.	14 (O) - 18 (O).
28	Chien de rue.	Paralytique.	Œil.	14 (O) - 16 (O).
29	Chien de rue.	Apporté mort.	Œil.	10 (O).
30	Jeune chien de rue.	Apporté mort.	Œil.	13 (O) - 13 (O).
31	Chien de rue.	Apporté mort.	Cerveau et œil.	12 (C) - 14 (C) - 12 (O).
32	Chien de rue.	Apporté mort.	Œil.	12 (O) - 13 (O).
33	Chien de rue.	Apporté mort.	Œil.	11 (O).
34	Chien de rue.	Paralytique.	Œil.	18 (O) - 18 (O).
35	Chien de chasse.	Cachectique.	Œil.	13 (O).
36	Chien de rue.	Furieux puis paral.	Œil.	14 (O)
37	Chien de rue.	Furieux puis paral.	Œil.	13 (O).

Les enseignements de ce tableau sont les suivants :

Inoculations sous-dure-mériennes.

Le bulbe de 15 chiens a été inoculé sous la dure-mère de 18 lapins. L'incubation a été :

De 10 jours pour.....	1 chien.
— 12 —	6 chiens.
— 13 —	3 —
— 14 —	3 —

Il n'a été observé aucune incubation supérieure à 14 jours.

Incubation moyenne : 12 jours.

Inoculations intra-oculaires.

Le bulbe de 22 chiens a été inoculé dans la chambre antérieure de 34 lapins. Il est arrivé plusieurs fois que deux ou trois lapins ayant été inoculés avec le même bulbe, les animaux ont présenté une incubation différente. L'écart, minime le plus souvent, s'est élevé à 10 jours dans une observation, à 13 jours dans une seconde. Il va de soi que le chiffre le plus faible doit, dans ces conditions, être seul pris en considération. De même, lorsqu'une inoculation a été faite à la fois sous la dure-mère et dans la chambre antérieure, c'est l'incubation de l'inoculation sous-dure-mérienne qui a été comptée. L'incubation a donc été :

De 10 jours pour.....	1 chien.
— 11 —	2 chiens.
— 12 —	2 —
— 13 —	5 —
— 14 —	4 —
— 15 —	3 —
— 16 —	1 chien.
— 17 —	2 chiens.
— 18 —	1 chien.
— 29 —	1 —

Incubation moyenne : 14 jours (confirmation de cette donnée classique qu'un virus rabique étant inoculé sous la dure-mère d'un premier et dans la chambre antérieure d'un second lapin, la rage se déclare en général chez ce dernier animal, avec un retard de 2 jours).

M. Martel a eu l'amabilité de nous envoyer le résultat de 19 inoculations intra-crâniennes, pratiquées semblablement chez le lapin au laboratoire de la fourrière municipale. La survie a été de :

14	jours.....	4	fois.
16	—	3	—
17	—	2	—
18	—	3	—
20	—	1	—
23	—	1	—
28	—	1	—
29	—	1	—
30	—	1	—
56	—	1	—
64	—	1	—

Chiffre moyen de la survie : 23 (de l'incubation : 21). Trois inoculations intra-oculaires ont donné des survies de 18, 19 et 23 jours.

Nous aurions voulu rapprocher également nos chiffres d'incubation de ceux de l'Institut Pasteur de Paris. D'après les renseignements qui nous ont été donnés par M. le Dr Chaillous, les bulbes des chiens suspects sont toujours inoculés à l'Institut Pasteur dans les muscles de la nuque du cobaye. Les conditions sont trop différentes pour qu'il puisse y avoir possibilité de comparaison.

Les chiens de rue n'ont donc pas la moindre immunité contre la rage. Contrairement à une opinion très répandue, la forme furieuse est, chez eux, deux fois plus fréquente que la forme paralytique. Celle-ci est plus rare à Constantinople qu'à Paris. Le virus des rues de Constantinople n'est nullement atténué. Il est renforcé au contraire et tue le lapin après une incubation moyenne de 12 jours, au lieu de 17 (chiffre moyen donné par les auteurs classiques), de 21 (statistique de Martel). Comment peut-on expliquer dans ces conditions la rareté de la rage chez les chiens errants?

Il faut, croyons-nous, mettre au premier plan des faits qu'au-
trefois nous avions relégués au second, suggestionné par la
doctrine classique et par un certain nombre de cas de rage para-
lytique observés au cours de promenades dans la ville. Les chiens
dits *errants* ne sont errants que relativement. Ils sont répartis
par quartiers où, plus exactement, par segments de rue, segments
d'autant plus restreints que la densité de la population est plus
considérable, c'est-à-dire la quantité des déchets culinaires
plus abondante. La limite entre les différentes zones est des plus
nette. C'est tel rebord de trottoir, telle saillie murale, telle rue
transversale, qui sépare les divers groupes. Aucun animal ne peut

dépasser la frontière sans s'exposer, de la part des animaux du secteur voisin, à une vindicte immédiate et terrible. De cette ligne frontière, les chiens ont une notion très exacte. L'appât d'un os ou d'un morceau de pain est lui-même insuffisant à la leur faire franchir. Même atteints de rage, les chiens demeurent dans la zone où ils sont nés, où s'est écoulée leur vie, et il leur est impossible d'aller, avec leurs morsures, répandre la maladie dans les différents quartiers... Dans un même quartier, la transmission de la maladie est rendue difficile par le merveilleux instinct des chiens de rue, qui les porte à fuir leurs congénères atteints de rage. Ceci même rendrait vraisemblablement sans grand danger le fait que, d'aventure, un chien sortirait de son territoire pour errer dans la ville. L'animal enragé est-il terré dans quelque coin? Ses camarades évitent avec le plus grand soin de s'approcher de lui et s'abstiennent totalement de le flairer ou de lui chercher noise. Le malade fait-il mine de quitter sa retraite? Ses congénères aboient contre lui de façon menaçante et, tout en se tenant à distance respectueuse, s'efforcent de l'effrayer et de lui faire regagner sa cachette. Seuls les très jeunes chiens se déparent de ces précautions. D'où le rôle important qui leur revient dans la transmission de la maladie... Déjà, en Europe, on voit rarement un chien enragé se jeter sur ses congénères sans provocation de leur part. Il ne mord la plupart du temps que les animaux venus l'agacer. On conçoit dès lors facilement que les chiens de rue rompent toutes relations avec leur camarade enragé ne soient mordus qu'exceptionnellement. Une circonstance de nature à rendre les morsures plus rares encore est que la rage furieuse paraît chez les chiens de rue — si l'on peut s'exprimer ainsi — *moins furieuse* que la rage furieuse classique, bien que présentant au complet tous les symptômes de cette affection. Si l'on en excepte ici encore les très jeunes chiens qui, eux, font souvent de nombreuses victimes (1), il est exceptionnel qu'à Constantinople un même chien enragé morde plus d'une ou de deux personnes. Il les mord une seule fois, presque toujours aux membres inférieurs. Il ne semble pas qu'il s'agisse là d'une atténuation du symptôme : *fureur* propre à tout l'Orient, ainsi que

(1) P. REYLINGER, La rage chez les jeunes chiens. *Revue générale de médecine vétérinaire*, 1^{er} décembre 1908.

M. Loir l'a avancé il y a quelques années. En effet, des diverses provinces de l'Empire ottoman, il n'est pas rare de voir arriver à l'Institut antirabique 10, 12, 15 individus mordus par le même chien; les morsures sont presque toujours multiples et intéressent fréquemment la face ou les membres supérieurs; à Constantinople même, les morsures des chiens de chasse ou des chiens de maisons affectent ces mêmes caractères. Faut-il voir dans ces particularités une conséquence de la très grande bonté, de l'extrême douceur de caractère des chiens de rue? Cette douceur, cette bonté persisteraient dans une certaine mesure jusqu'au cours de cette terrible maladie qu'est la rage... Nous n'oserrions l'affirmer. Quoi qu'il en soit, c'est dans les mœurs très spéciales des chiens de rue, dans leur répartition sévèrement maintenue en groupes bien distincts, dans leur instinct très subtil qui les porte à fuir leur congénère atteint de rage, plutôt que dans des modifications de la maladie elle-même qu'il faut avant tout, croyons-nous, chercher la cause de la grande rareté de la rage à Constantinople. M. Martel dont la compétence en la matière est bien connue, a bien voulu nous signaler un argument important et imprévu, en faveur de cette manière de voir. Les cartogrammes indiquant l'influence à Paris de la capture des chiens errants sur la fréquence de la rage (1), montrent très nettement que les effets des captures s'exercent par arrondissement. Tel arrondissement dans lequel il est fait peu de captures à de la rage, sans que les arrondissements voisins s'en ressentent beaucoup. La dissémination de la rage paraît ainsi plus difficile qu'il ne semblerait *à priori*. Même à Paris où les chiens errants sont libres de parcourir la ville en tous sens, ils ne propagent guère la maladie en dehors du quartier auquel ils appartiennent... On conçoit que la difficulté de propagation soit bien plus considérable à Constantinople, où les chiens sont répartis par segments de rue, segments dont la longueur — à Pétra par exemple où les maisons à appartements dominent — n'excède pas cinquante mètres.

**

Du 15 novembre 1900 au 15 novembre 1908, 6,808 personnes ont été soumises à l'Institut antirabique de Constantinople, aux

(1) MARTEL, *Rapport sur les opérations du service sanitaire vétérinaire de Paris et du département de la Seine pendant l'année 1907*, page 12.

vaccinations pasteuriennes. Les personnes traitées ne peuvent malheureusement pas être divisées comme dans les autres Instituts, en trois catégories, suivant que la rage de l'animal mordeur a été constatée expérimentalement, certifiée à la suite d'un examen vétérinaire ou présumée d'après l'interrogatoire du mordu. Ce serait se montrer bien exigeant que de demander aux autorités l'envoi à l'Institut antirabique d'un bulbe, ou simplement d'une tête. Même à Constantinople, il est exceptionnel qu'un vétérinaire soit appelé à donner son avis à l'occasion d'une morsure. L'immense majorité des personnes traitées rentre donc dans la 3^{me} catégorie de l'Institut Pasteur de Paris.

Au point de vue du siège de leurs morsures, ces 6,808 personnes se décomposent de la manière suivante :

	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	T. d'el
Tête.....	32	33	38	88	45	82	43	55	416
Membres supérieurs..	497	301	314	460	348	320	349	373	2632
Tronc	415	19	50	42	22	21	26	22	317
Membres inférieurs...	228	397	492	485	394	450	469	528	3443
	372	750	894	4075	809	873	857	978	6808

Les animaux mordeurs appartiennent à des espèces variées comme le montre ce tableau :

	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	TOTAL
Chien.....	552	692	837	1009	741	814	807	897	6349
Chat.....	14	22	45	34	28	10	26	44	193
Loup.....	2	15	15	7	5	26	4	6	80
Chacal.....	1	14	16	8	16	5	9	5	74
Ane.....	1	0	4	3	4	12	4	9	37
Homme.....	0	0	2	7	11	2	2	3	27
Cheval.....	2	4	3	4	1	2	1	0	17
Vache.....	0	0	0	1	1	1	3	5	11
Rat.....	0	0	0	1	1	0	1	6	9
Mulet.....	0	2	2	0	0	0	0	1	5
Hyène.....	0	1	0	0	0	0	0	1	2
Mouton.....	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Chevre.....	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Chameau'.....	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Martre.....	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Plus intéressante est l'étude des résultats obtenus. Sur 6,808 personnes admises à suivre le traitement antirabique, 6,709 ont échappé à la rage, et 99 ont succombé à cette affection (mortalité totale : 1,45 0/0). Cependant on sait que le traitement pasteurien ne confère pas l'immunité, dès qu'il est terminé, mais seulement quinze jours environ après la dernière injection. Il est donc juste — et c'est la tradition de tous les Instituts Pasteur — d'envisager séparément les cas de rage apparus au cours du traitement, et enfin plus de quinze jours après la fin des inoculations. Ces derniers cas seuls doivent être comptés comme insuccès. Le tableau suivant fait ressortir un fait intéressant :

Années.	Nombre de personnes traitées.	Morts au cours du traitement.	Morts moins de 15 jours après le traitement.	Morts plus de 15 jours après le traitement.	TOTAL
1901.	372	5	1	1	7
1902.	750	5	4	4	13
1903.	894	9	1	3	13
1904.	1073	7	1	3	11
1905.	809	5	4	3	12
1906.	873	12	5	1	18
1907.	857	5	2	1	8
1908.	978	12	2	3	17
	6808	60 (0,88 0/0)	20 (0,29 0/0)	19 (0,27 0/0)	99 (1,45 0/0)

Sur 99 cas de mort, 19 seulement se sont produits plus de quinze jours après la fin du traitement. La mortalité réelle descend ainsi de 1,45 0/0 à 0,27 0/0. C'est une des plus basses qui aient été obtenues. 20 personnes (0,29 0/0) ont succombé pendant la quinzaine qui a suivi la fin du traitement. Enfin, 60 personnes (0,88 0/0) ont pris la rage au cours même du traitement antirabique. Ce chiffre est bien supérieur à celui qui est observé, dans les mêmes conditions, dans les autres Instituts. Ce qui caractérise donc essentiellement l'Institut de Constantinople, c'est le grand nombre de personnes qui succombent à la rage au cours des inoculations, avant que celles-ci aient eu le temps d'agir. Quelle est la cause de cette particularité?

On sait que la vaccination antirabique est une lutte de vitesse entre le virus et le vaccin. Le vaccin doit avoir immunisé les centres nerveux avant que le virus n'y parvienne. D'où l'importance capitale qu'il y a pour un mordu à venir suivre le traitement antirabique, le plus tôt possible après l'accident.

Ce fait est universellement reconnu et il est devenu bien rare qu'un mordu tarde plus d'une semaine à se soumettre aux inoculations. A Constantinople, les choses se passent de façon toute différente. Le tableau suivant donne en effet l'époque d'arrivée à l'Institut de nos 6,808 malades.

ARRIVÉE A L'INSTITUT	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	TOTAL
Du 1 ^{er} au 5 ^e jour.....	41	131	152	190 275	171	171	243	222	1324
Du 5 ^e au 10 ^e —	148	220	279		232	246	225	289	1914
Du 10 ^e au 15 ^e —	139	183	247	269	180	236	175	224	1653
Du 15 ^e au 20 ^e —	117	96	121	188	112	90	106	128	938
Du 20 ^e au 25 ^e —	88	62	53	73	56	60	48	55	495
Du 25 ^e au 30 ^e —	28	31	24	42	39	22	20	20	226
Du 30 ^e au 35 ^e —	3	7	12	15	6	20	13	12	88
Du 35 ^e au 40 ^e —	7	7	3	10	6	12	7	7	59
Du 40 ^e au 45 ^e —	4	8	2	6	4	4	7	9	38
Après le 45 ^e —	0	5	4	7	6	9	13	12	53
	372	750	894	1075	809	873	857	978	6808
Jour moyen.....	13 ^e	12 ^e	12 ^e	13 ^e	13 ^e	13 ^e	12 ^e	1	

Ainsi, sur 6,808 personnes, 3,238 seulement (47,56 0/0) se sont présentées à l'Institut dans les dix jours qui ont suivi la morsure; 2,611 (38,33 0/0) sont arrivées du dixième au vingtième jour; 721 (10,59 0/0) du vingtième au trentième. Enfin 238 (3,49 0/0) n'ont pu commencer leur traitement que plus de 30 jours après la morsure. Le jour moyen de l'arrivée des malades a été le treizième! L'éloignement de la capitale, les difficultés des communications ne sont qu'en partie cause de cet état de choses déplorable. La responsabilité en revient presque tout entière à l'apathie, à l'indifférence des autorités. Contre cette indifférence, nous avons tenté, pendant huit années, de lutter à l'aide des faibles moyens dont nous disposions: circulaires, articles de journaux, etc., etc. Nos efforts sont demeurés sans le moindre résultat(1). Nous n'avons guère été plus heureux dans les tentatives que nous avons faites pour essayer d'arriver à un établissement plus précoce de l'immunité antirabique. Nous avions fondé à un moment de grandes espérances sur l'adjonction au traitement classique d'inoculations sous-cutanées de mélange de sérum antirabique et d'émulsion centésimale de virus fixe. Les premiers résultats obtenus avaient paru encourageants; ils ne se sont malheureusement pas maintenus par la suite. Déçu de ce côté,

(1) Il va de soi que ces constatations se rapportent exclusivement à l'ancien régime turc sous lequel nos statistiques ont été recueillies.

TABLEAU I

PERSONNES PRISES DE RAGE AU COURS DU TRAITEMENT

Nos.	Sexe.	Age.	Animal mordeur.	Siège des morsures.	Nombre des morsures.	Arrivé au:	Pris de rage au:
1	H	5	Chien.	Poignet.	1	31 ^e jour (1)	9 ^e jour.
2	H	40	Chien.	Face.	3	10 ^e »	20 ^e »
3	H	45	Chien.	Face.	1	15 ^e »	11 ^e »
4	H	33	Chien.	Mains.	5	38 ^e »	9 ^e »
5	H	7	Loup.	Face.	1	28 ^e »	16 ^e »
6	H	64	Loup.	Face.	4	12 ^e »	13 ^e »
7	H	18	Loup.	Face.	6	28 ^e »	8 ^e »
8	H	28	Loup.	Main.	6	22 ^e »	10 ^e »
9	H	25	Chien.	Face.	4	4 ^e »	22 ^e »
10	H	24	Chien.	Main.	2	21 ^e »	12 ^e »
11	H	46	Chien.	Main.	6	5 ^e »	16 ^e »
12	H	18	Chien.	Face.	1	13 ^e »	9 ^e »
13	H	8	Chien.	Face.	1	10 ^e »	20 ^e »
14	H	40	Loup.	Face.	7	13 ^e »	23 ^e »
15	H	70	Loup.	Face.	7	13 ^e »	18 ^e »
16	H	75	Loup.	Face.	2	13 »	14 ^e »
17	F	42	Loup.	Main.	2	13 »	15 ^e »
18	H	30	Chacal.	Main.	9	14 ^e »	3 ^e »
19	H	22	Chien.	Face.	18	16 ^e »	10 ^e »
20	H	40	Chien.	Mains.	9	35 ^e »	16 ^e »
21	H	5	Chien.	Main.	2	22 ^e »	16 ^e »
22	H	11	Chien.	Avant-bras.	1	21 ^e »	17 ^e »
23	H	13	Chien.	Face.	4	18 ^e »	14 ^e »
24	H	70	Chacal.	Face.	3	8 ^e »	14 ^e »
25	H	35	Chien.	Main.	50	8 ^e »	25 ^e »
26	H	40	Chien.	Face.	4	25 ^e »	1 ^e »
27	H	3	Chien.	Face.	2	22 ^e »	13 ^e »
28	H	16	Chacal.	Face.	4	16 ^e »	9 ^e »
29	H	4	Chien.	Face.	1	6 ^e »	10 ^e »
30	H	29	Chien.	Face.	1	10 ^e »	22 ^e »
31	H	6	Chien.	Face.	5	4 ^e »	24 ^e »
32	H	5	Chien.	Face.	1	17 ^e »	25 ^e »
33	H	40	Chien.	Face.	2	16 ^e »	1 ^e »
34	H	55	Renard.	Face.	3	18 ^e »	9 ^e »
35	H	24	Chien.	Face.	6	19 ^e »	11 ^e »
36	H	33	Loup.	Main.	22	12 ^e »	14 ^e »
37	H	8	Loup.	Face.	7	12 ^e »	21 ^e »
38	H	49	Loup.	Face.	6	12 ^e »	25 ^e »
39	H	12	Loup.	Face.	23	12 ^e »	17 ^e »
40	H	5	Loup.	Face.	10	12 ^e »	7 ^e »
41	H	19	Chien.	Main.	4	35 ^e »	5 ^e »
42	H	7	Chien.	Face.	3	14 ^e »	15 ^e »
43	F	13	Chien.	Pied.	4	33 ^e »	12 ^e »
44	H	50	Chien.	Face.	11	24 ^e »	4 ^e »
45	F	7	Chien.	Face.	2	3 ^e »	15 ^e »
46	H	27	Loup.	Face.	9	15 ^e »	18 ^e »
47	H	30	Loup.	Face.	6	15 ^e »	24 ^e »
48	F	18	Loup.	Jambe.	5	15 ^e »	25 ^e »
49	H	6	Chien.	Nuque et avant-bras.	2	45 ^e »	12 ^e »
50	H	40	Chien.	Face.	4	17 ^e »	12 ^e »
51	H	8	Chien.	Face.	12	13 ^e »	26 ^e »
52	H	18	Loup.	Face.	7	34 ^e »	4 ^e »
53	F	4	Chien.	Face.	1	20 ^e »	12 ^e »
54	F	5	Chien.	Face.	1	17 ^e »	24 ^e »
55	H	42	Chien.	Face.	2	17 ^e »	17 ^e »
56	H	11	Loup.	Face.	4	9 ^e »	10 ^e »
57	H	45	Loup.	Face.	5	9 ^e »	20 ^e »
58	H	8	Chien.	Face.	4	20 ^e »	26 ^e »
59	F	16	Chien.	Face.	1	13 ^e »	9 ^e »
60	H	21	Chien.	Face.	3	18 ^e »	24 ^e »

(1) On a mis en italique les facteurs auxquels il a paru logique d'attribuer le décès.

TABLEAU II

PERSONNES PRISES DE RAGE MOINS DE 15 JOURS APRÈS LA FIN DU TRAITEMENT

Nos	Sexe.	Age	Animal mordeur.	Siège des morsures.	Nombre des morsures.	Arrivé au :	Pris de rage au :
1	H	8	Chien.	<i>Face.</i>	3	20 ^e jour (1)	9 ^e jour.
2	H	21	<i>Loup.</i>	Main.	3	22 ^e »	1 ^{er} »
3	H	6	Chien.	<i>Face.</i>	1	5 ^e »	3 ^e »
4	H	20	Chien.	Mains.	12	20 ^e »	8 ^e »
5	F	40	Chien.	Mains.	9	18 ^e »	1 ^{er} »
6	F	9	Chien.	Avant-bras.	20	14 ^e »	2 ^e »
7	H	24	Chien.	Main.	4	7 ^e »	3 ^e »
8	H	35	Chien.	Main.	11	11 ^e »	10 ^e »
9	F	28	Chacal.	<i>Face.</i>	4	8 ^e »	6 ^e »
10	H	50	Chacal.	Jambe.	5	8 ^e »	4 ^e »
11	H	42	<i>Loup.</i>	<i>Face.</i>	98	3 ^e »	8 ^e »
12	H	47	<i>Loup.</i>	<i>Face.</i>	34	3 ^e »	4 ^e »
13	H	62	Chien.	Main.	13	5 ^e »	6 ^e »
14	F	60	Chien.	<i>Face.</i>	4	7 ^e »	9 ^e »
15	F	5	Chien.	<i>Face.</i>	7	3 ^e »	11 ^e »
16	H	3	Chien.	Main.	2	4 ^e »	2 ^e »
17	H	3	Chien.	<i>Face.</i>	3	3 ^e »	13 ^e »
18	H	45	Chien.	<i>Face.</i>	12	7 ^e »	10 ^e »
19	H	21	Chien.	Main.	13	8 ^e »	6 ^e »
20	H	35	Chien.	Main.	5	9 ^e »	8 ^e »

(1) On a mis en italique les facteurs auxquels il a paru logique d'attribuer le décès.

TABLEAU III

PERSONNES PRISES DE RAGE PLUS DE 15 JOURS APRÈS LA FIN DU TRAITEMENT

Nos	Sexe.	Age	Animal mordeur.	Siège des morsures.	Nombre des morsures.	Arrivé au :	Pris de rage au
1	H	48	Chien.	Mains.	4	5 ^e jour (1)	1 an.
2	H	62	<i>Loup.</i>	Mains.	7	27 ^e »	16 ^e jour.
3	H	30	<i>Loup</i>	<i>Face.</i>	7	13 ^e »	2 ^e mois.
4	H	27	Chien.	Pied.	2	10 ^e »	30 ^e jour.
5	F	16	Chien.	Jambe.	2	13 ^e »	20 ^e »
6	H	18	Chien.	Main.	2	2 ^e »	39 ^e »
7	H	18	Chien.	Avant-bras.	3	10 ^e »	6 ^e mois.
8	H	16	Chien.	Main.	3	17 ^e »	70 ^e jour.
9	H	43	Chien.	Jambe.	2	15 ^e »	36 ^e »
10	H	3	Chien.	<i>Face.</i>	1	16 ^e »	2 ^e mois.
11	F	60	Chien.	Avant-bras.	2	6 ^e »	52 ^e jour.
12	F	55	Chien.	Main.	13	6 ^e »	35 ^e »
13	H	35	Chien.	Main.	4	9 ^e »	8 ^e mois.
14	H	35	Chien.	Poignet.	5	4 ^e »	39 ^e jour.
15	H	32	Chien.	Mains.	9	15 ^e »	22 ^e »
16	H	3	Chien.	<i>Face.</i>	10	4 ^e »	20 ^e »
17	H	59	Chien.	Mains.	24	8 ^e »	19 ^e »
18	H	30	Chien.	Mains.	2	6 ^e »	45 ^e »
19	H	3	Chien.	<i>Face.</i>	4	13 ^e »	38 ^e »

(1) On a mis en italique les facteurs auxquels il a paru logique d'attribuer le décès.

nous avons pris le parti de « corser » dans les cas graves et chez les retardataires le traitement classique (début du traitement par de la moelle de 8 jours; multiplication des inoculations les premiers jours; inoculation chaque fois d'une grande quantité de moelle : un centimètre et davantage). Le tableau précédent, donnant année par année les chiffres de mortalité, montre que les résultats obtenus sont très contestables. Notre conviction est que, contre le danger que courrent les mordus en venant se faire inoculer tardivement, la science est à peu près complètement désarmée.

L'étude détaillée de nos 99 cas de mort, permet de relever quelques particularités intéressantes. Les tableaux qui suivent donnent pour chacune des trois catégories de décès (morts au cours du traitement; morts pendant la quinzaine suivante; morts plus de quinze jours après la fin du traitement) le sexe et l'âge du mordu, l'espèce de l'animal mordeur; le siège et le nombre des morsures, la date du début des inoculations et l'époque de la mort.

La simple inspection du tableau I (personnes prises de rage au cours du traitement) montre que, dans chaque cas, il est extrêmement facile de se rendre compte de la cause de l'insuccès. Presque toujours, c'est le retard considérable apporté à venir suivre les inoculations (31, 33, 35, 38 jours dans certaines observations). D'autres fois c'est le siège et le nombre des morsures (12, 18, 23 morsures à la face; 22, 50 morsures aux mains) ou bien il s'agit de morsures de loup (19 cas). Souvent même, toutes ces causes d'insuccès se trouvent réunies chez un même malade. C'est ainsi que nous voyons des personnes mordues à la face par des loups, en 6, 7, 9, 10, 23 endroits différents, venir seulement se faire traiter au 12^e, au 13^e, au 15^e, au 28^e, au 34^e jour ! Que peut-on espérer du traitement antirabique dans de pareilles conditions !

L'examen du tableau II (personnes prises de rage moins de 15 jours après la fin du traitement) montre également que, dans la très grande majorité des cas, il est facile de se rendre compte de la cause du décès. Il s'agit de loups (3 cas) de morsures à la face (9 observations), de morsures multiples (12, 13, 20, 34, 98 morsures dans certaines observations) ou de retards considérables apportés à venir suivre le traitement (14, 18, 20, 22 jours).

Souvent aussi on trouve réunies chez un même sujet, plusieurs, sinon la totalité de ces causes d'insuccès. Il faut avouer cependant que, chez quelques malades, la cause du décès n'apparaît pas tout à fait avec la même netteté. Un enfant pris de rage deux jours après la fin du traitement avait été mordu à la main par un chien en deux endroits seulement, et les inoculations avaient été commencées le jour même de l'accident. Un autre enfant chez qui la rage se déclara 3 jours après la fin des inoculations avait été mordu, il est vrai, à la lèvre supérieure, mais il n'existe qu'une seule trace de dents, et le traitement avait été commencé dès le cinquième jour. Il s'agissait bien probablement dans ces cas de ces virus renforcés tels qu'il s'en rencontre si fréquemment parmi les virus de rue de Constantinople, mais peut-être cette explication donne-t-elle moins satisfaction à l'esprit que celle du nombre ou de la gravité des morsures, ou encore celle du retard apporté à commencer le traitement...

Si maintenant nous passons à l'examen des 19 cas de mort survenus plus de quinze jours après la fin du traitement (tableau III) nous voyons que la cause de l'insuccès ressort, dans la moitié des cas seulement, d'un des motifs invoqués plus haut (morsures de loups; morsures à la face; morsures multiples aux mains; retards considérables). Dans l'autre moitié des observations, la cause du décès échappe totalement. Un homme de 48 ans, mort de rage un an après la fin du traitement avait été mordu à la main très légèrement et les inoculations avaient été commencées le cinquième jour. Un homme de 27 ans est mordu au pied de façon très bénigne (2 traces de dents) et commence le traitement le dixième jour. Il succombe à la rage cinquante jours après la fin des injections. Ni l'alcoolisme, ni un traumatisme physique ou moral ne pouvaient être accusés, dans ces cas, de l'échec des inoculations. Il faut avouer que si la cause des insuccès apparents de la méthode pasteurienne (morts pendant le traitement ou pendant la quinzaine) est toujours facile à trouver, la cause de certains insuccès réels (morts plus de quinze jours après la fin du traitement) demeure souvent entourée de quelque mystère.¹

* * *

Dans tous les Instituts antirabiques, un certain nombre de sujets admis à la cure parce que mordus par un animal suspect

de rage, ont en réalité été mordus par un animal atteint d'une autre maladie, voire par un animal sain. Il nous a paru intéressant de rechercher pour les mordus de Constantinople, et la courte période où nous avons été chargé de la fourrière, l'importance de cette cause d'erreur dans l'appréciation des statistiques. Du 15 novembre 1907 au 15 novembre 1908, il a été soigné à l'Institut antirabique 157 personnes de Constantinople et 821 des provinces. Pour ces 157 personnes de Constantinople, nous avons pu inoculer au lapin le bulbe de 65 animaux mordeurs, représentant 91 personnes mordues. Ces inoculations ont été positives au point de vue du développement de la rage 39 fois (52 malades) négatives 26 fois (39 malades). Il en résulte que le traitement antirabique s'est trouvé justifié dans 57 0/0 des cas. On sait que Rodet à Montpellier, et Murat à Alger, sont arrivés à des chiffres un peu inférieurs (45 0/0 Rodet; 41,6 0/0 Murat).

Il n'est pas non plus sans intérêt de faire remarquer qu'en quatre années nous avons eu connaissance de 47 cas de morts par rage, survenus en Turquie chez des personnes soignées par des empiriques ou n'ayant subi aucun traitement. Ces 47 cas se répartissent ainsi :

Du 15 novembre 1904 au 15 novembre 1905.....	10
— 1905 — 1906	10
— 1906 — 1907	20
— 1907 — 1908	7
	— 7 —

Soit une moyenne de 12 cas par an. Nous avons eu connaissance de ces cas, soit en lisant par hasard les « faits divers » des journaux de Constantinople, soit en recevant à l'Institut antirabique, des personnes qui craignaient d'avoir été contaminées par un parent ou par un voisin mort de la rage sans avoir suivi de traitement. On comprendra que, dans ces conditions, les chiffres qui précèdent doivent être considérés comme très inférieurs à la réalité.

Dans 20 de ces cas de mort, il nous a été possible de fixer exactement la chronologie du décès, et la question ayant été posée de savoir si le traitement pasteurien pouvait favoriser l'élosion de la rage chez une personne en incubation (1), il nous a paru intéressant de rapprocher cette chronologie de celle de

(1) NITSCH, Bemerkungen über die Pasteuruche methode der Schützimpfungen gegen Tollwüth. *Centr. f. Bakter.*, I, Abt. Originale, Bd. XLII, H. 7 et 8, 19 nov. et 11 déc. 1906.

50 cas de rage survenus pendant la même période chez des personnes subissant ou ayant subi les inoculations. Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

MORTS APRÈS LA MORTURE								
	JUSQU'A 25 jours	DU 26 ^e au 30 ^e	DU 31 ^e au 35 ^e	DU 36 ^e au 40 ^e	DU 41 ^e au 50 ^e	DU 51 ^e au 60 ^e	PLUS de 60 J.	TOTAL
Traités	3	7	10	5	13	2	10	50
Non traités....	7	3	1	3	2	2	2	20
<i>Pourcentages :</i>								
Traités	6 0/0	14 0/0	20 0/0	10 0/0	26 0/0	4 0/0	20 0/0	
Non traités....	35 0/0	15 0/0	5 0/0	15 0/0	10 0/0	10 0/0	10 0/0	

Ainsi, en Turquie, la mort se produit plus tardivement chez les personnes qui subissent le traitement que chez celles qui n'y sont point soumises.

Dans les trente premiers jours qui suivent la morsure, on trouve une mortalité de 20 0/0 chez les traités et de 50 0/0 chez les non traités. Au contraire, après le quarantième jour, il meurt 50 0/0 des traités et 30 0/0 des non traités. A Paris, à Varsovie et à Cracovie (statistique de Nitsch) on trouve dans les trente premiers jours qui suivent la morsure une mortalité de 30 0/0 chez les traités et de 10 0/0 chez les non traités. Après le quarantième jour, il meurt 51 0/0 des traités et 78 0/0 des non traités.

Jusqu'au quarantième jour après la morsure, il meurt à Constantinople 50 0/0 des personnes traitées et 70 0/0 des personnes non traitées. A Paris, à Varsovie et à Cracovie (Nitsch), il meurt dans ces mêmes conditions 48,57 0/0 des personnes traitées et 22 0/0 des personnes non traitées. Après le cinquantième jour qui suit la morsure, il meurt en Turquie 24 0/0 des personnes traitées et 20 0/0 des personnes non traitées. A Paris, à Varsovie, et à Cracovie (Nitsch), il meurt après le cinquantième jour 36,42 0/0 des personnes traitées et 75 0/0 des personnes non traitées.

Si nous comparons enfin la statistique de Constantinople à

celle bien connue de Baüer (1) basée sur 500 cas de mort survenus chez des personnes n'ayant pas subi le traitement antirabique, on voit qu'avant le trentième jour il meurt en Turquie 50 0/0 des mordus qui ne suivent pas le traitement, au lieu de 13,42 0/0 (Baüer). Après le soixantième jour, il en meurt 10 0/0 et non 46 0/0 (Baüer).

L'écart entre les chiffres de Nitsch et de Baüer d'une part, et les nôtres d'autre part, est en rapport, selon toute vraisemblance, avec le renforcement du virus chez les chiens de rue signalé dans la première partie de ce travail. Toujours est-il qu'en Turquie tout au moins, la mort se produit plus tôt chez les personnes qui ne se soumettent pas à la cure pasteurienne que chez celles qui suivent le traitement. Il semble qu'on soit en droit d'en conclure que le traitement antirabique n'est nullement capable de favoriser l'écllosion de la rage (2).

* * *

Nous désirons enfin donner de l'efficacité de la méthode pasteurienne une preuve tout à fait nouvelle, croyons-nous. On sait avec quelle régularité fonctionnent partout les Instituts antirabiques. Il n'est pour eux ni vacances, ni jours fériés, et on conçoit qu'il soit difficile de savoir exactement à quel danger échappent les personnes en traitement puisque celui-ci n'est jamais suspendu. Le 1^{er} décembre 1903, en arrivant comme de coutume à l'Institut antirabique, nous ne fûmes pas peu surpris d'y trouver un Iradé (ordre) impérial, décrétant la fermeture immédiate de l'Institut et son transfert « en un point quelconque de la côte d'Asie ». Il nous était formellement interdit de « toucher à aucun objet, excepté pour l'emballer »... Déjà des personnes zélées avaient commencé le déménagement. Nos efforts pour faire rapporter cette mesure se heurtèrent à l'effroi des uns, à l'indifférence des autres. Force fut d'interrompre le traitement antirabique pendant huit jours, du 1^{er} au 9 décembre, en attendant qu'un nouveau laboratoire pût être installé. 33 personnes étaient en traitement le 1^{er} décembre 1903. 5 étaient à la veille de terminer leur cure et furent renvoyées chez elles; 4 quittèrent

(1) BAÜER, *Über die Inkubationsdauer der Wütkrankheit bei Menschen. Münchener medicinische Wochenschrift*, 1886, n° 36-39.

(2) Pour plus de détails voir *P. Rem'inger*. Le traitement pasteurien peut-il favoriser l'écllosion de la rage chez une personne en incubation? *Journal de Physiologie et de Pathologie générale* 1907, p. 285-289.

Constantinople à destination d'un autre Institut et furent perdues de vue. Chez 24 mordus, le traitement fut suspendu, puis repris après huit jours d'interruption. L'un des malades mourut de rage quelques jours après la reprise; un deuxième dans la quinzaine qui suivit la fin des inoculations; un troisième plus de quinze jours après la fin du traitement. Cette mortalité globale (12,50 0/0) est intéressante à rapprocher de la mortalité globale (1,45 0/0) fournie par nos 6,808 mordus. Il ne semble pas qu'il se soit agi d'une « série » malheureuse. Ces 24 malades présentaient une gravité très inférieure à la moyenne. Une seule des 3 personnes décédées avait été mordue à la face.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

